



This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

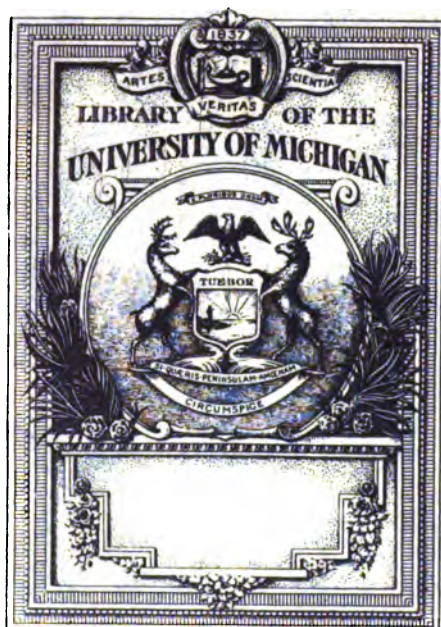
Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

- + *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.
- + *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.
- + *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.
- + *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at <http://books.google.com/>



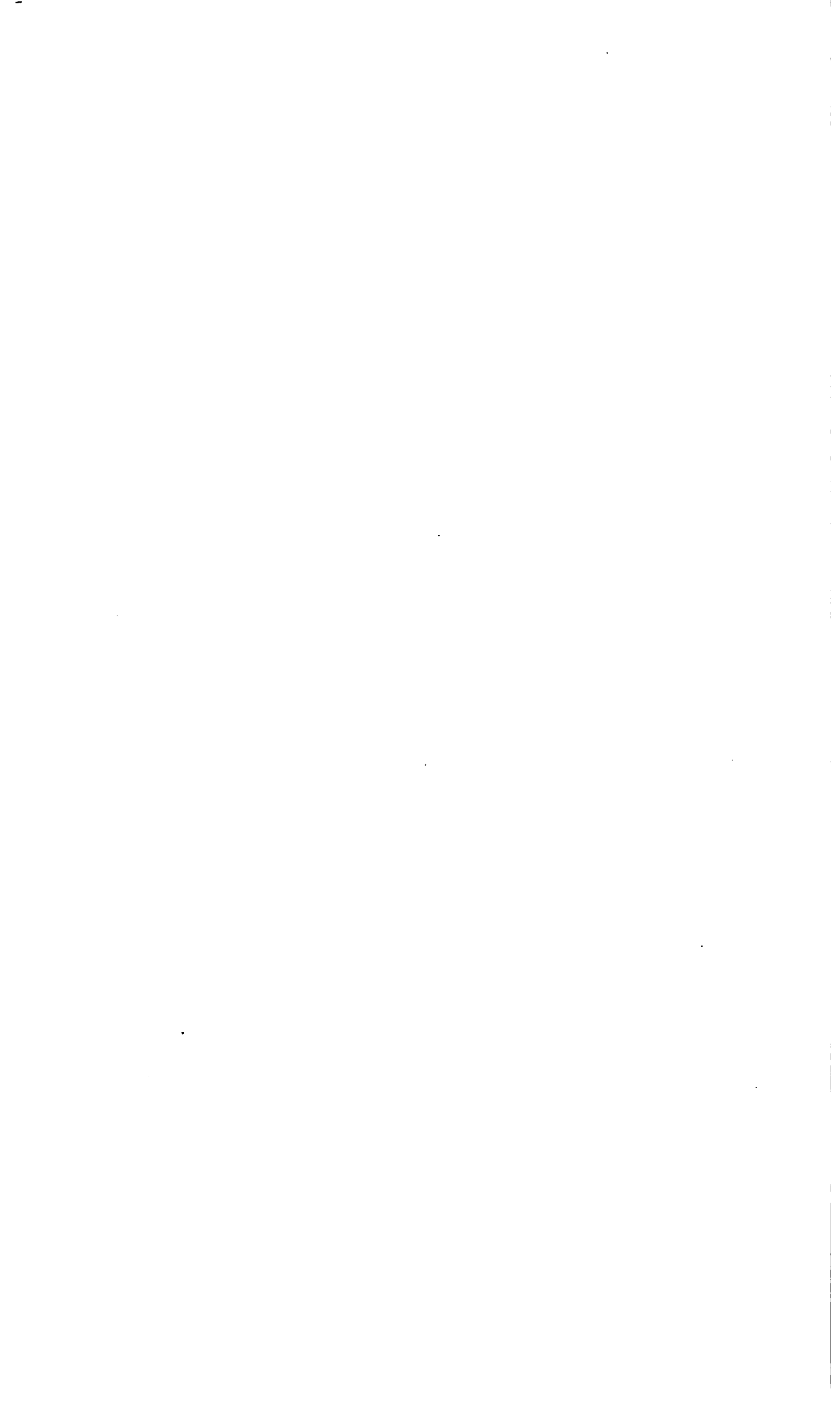
RECEIVED IN EXCHANGE
FROM
Carlsberg Laboratorium



QR

1

.C3



97
1
03

Feb 3 1904

Carlsberg Laboratorium
COMPTES-RENDUS

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG

6me VOLUME, 1re LIVRAISON

Un

97



COPENHAGUE

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP

IMPRIMERIE DE THIELE

1903

Prix: 2 Kr.

Toutes les indications thermométriques sont *centigrades*.

kgr. kilogramme	l. litre
gr. gramme	cc. centimètre cube
cgr. centigramme	cm. centimètre
mgr. milligramme	mm. millimètre
	μ . micromillimètre



LES COMPTES-RENDUS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE CARLSBERG

paraissent par livraisons à des époques indéterminées. A mesure qu'il en paraîtra un nombre suffisant pour faire un volume, les abonnés recevront un titre en même temps qu' une table des matières, avec l'indication de la période qu' embrasse le volume.

COMPTES-RENDUS
DES TRAVAUX
DU
LABORATOIRE DE CARLSBERG

6^{ME} VOLUME.
ÉDITION FRANÇAISE.
1903—1906.

COPENHAGUE
EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP
IMPRIMERIE DE THIELE
1906

4
 1903
 1903
 1903

TABLE DES MATIÈRES DU TOME SIXIÈME.

Première livraison, 1903.

	Page
Études sur la synthèse des acides amidés par S. P. L. SØRENSEN.....	1
I. Éther phtalimidomalonique.....	6
1. Préparation et propriétés.....	6
2. Éther phtalimidosomalonique.....	10
II. Phénylalanine.....	13
1. Éther benzylphtalimidomalonique.....	14
2. Acide phtalamique-benzylmalonique tribasique.....	17
3. Phénylalanine.....	18
III. Acide α -aminoadipique.....	20
1. Éther butyronitrile-phtalimidomalonique.....	22
2. Acide α -aminoadipique.....	24
3. Acide benzoyl- α -aminoadipique.....	31
IV. Acide α - δ -diaminovalérique.....	32
1. Éther phtalimido- γ -phtalimidopropyl-malonique.....	34
2. Acide phtalamique- γ -propylphtalamique-malonique.....	38
3. Acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique (ou acide ornithurique artificiel).....	44
4. Ornithurate de chaux.....	49
5. Acide monobenzoyle- α - δ -diaminovalérique (Monobenzoyleornithine).....	52
6. Combinaison d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne de l'acide α - δ -diaminovalérique.....	54
Appendice.....	60

Deuxième livraison, 1903.

Études sur les bactéries dites Sarcines et sur les maladies qu'elles provoquent dans la bière par N. HJELTE CLAUSSEN.....	64
I. Isolation des Pédicoques qui se trouvent dans la bière et dans la levure.....	66
II. Morphologie.....	70
III. Physiologie.....	73
VI. Récapitulation et remarques finales.....	81
Une espèce nouvelle de Saccharomyces: Sacch. Saturnus Klöcker, ayant des spores caractéristiques par ALB. KLÖCKER.....	84
Sur la classification du genre Penicillium, et description d'une espèce nouvelle formant des asques par ALB. KLÖCKER.....	92
Nouveau genre de la famille des Saccharomycètes par H. SCHIÖNNING.....	103

Troisième livraison, 1905.

	Page
Sur la méthode de Kjeldahl pour le dosage de l'azote par S. P. L. SØRENSEN	
et C. PEDERSEN.....	126
1. Créatine.....	132
2. Créatinine.....	133
3. Acide urique.....	134
4. Combinaisons de lysine.....	134
Études sur la synthèse des acides aminés par S. P. L. SØRENSEN.....	137
V. Acide α -amino- δ -oxyvalérique.....	137
1. Éther γ -brompropyle-phtalimidomalonique.....	148
2. Acide α -amino- δ -oxyvalérique.....	150
3. Transformation de l'acide α -amino δ oxyvalérique en acide pyrrolidine- α -carbonique.....	168
4. Glycocolle allylique.....	186
La Teneur en azote de la lysine et des composés analogues peut-elle être dosée par la méthode de Kjeldahl? Par S. P. L. SØRENSEN et A. C. ANDERSEN...	193
Études sur la synthèse des acides aminés par S. P. L. SØRENSEN.....	209
VI. Dédoublement de l'acide ornithurique racémique en formes optiquement actives.....	209
1. Ornithurate droit de brucine.....	210
2. Ornithurate gauche de cinchonine.....	215
3. Acides ornithuriques droit et gauche.....	219
4. Ornithurates droit et gauche de chaux.....	222
5. Ornithines monobenzoyliques droite et gauche.....	223
6. Combinaisons d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne des ornithines droite et gauche.....	224

Quatrième livraison, 1906.

On the Protein Substances of Barley, in the Grain itself and during the Brewing Processes. By H. SCHJERNING.....	229
First Section: On the Formation and Transformation of Protein Substances during the Growth, Ripening and Storage of Barley.....	231
1. Introduction.....	231
2. Methods of Working.....	238
3. Experimental Errors.....	250
4. Principal Experiments.....	255
5. Interpretation of the Barley Ripening Experiments.....	267
6. The Barley Ripening and Storage Experiments viewed from a practical standpoint.....	285
7. Researches on the Chemical Composition of the Dry Matter of Barley as dependent on Differences of Species, Variety and Type.....	291
8. Concluding Remarks.....	303
9. Main Results.....	305

Carlsberg Laboratorium
et
1-20-1926

ÉTUDES SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMIDÉS

PAR
S.-P.-L. SØRENSEN

Parmi les produits de la décomposition des substances protéiques, les acides amidés ont toujours occupé une place importante, qui leur a encore été maintenue par les nombreuses et profondes recherches faites pendant ces dix dernières années. A côté des acides monoamidés monobasiques (glycine, leucine, alanine, tyrosine, etc.) connus déjà depuis longtemps, et des acides monoamidés bibasiques (acides asparaginique et glutaminique), les recherches exécutées par Drechsel, Schulze, Hedin, Kossel, et plusieurs autres savants, surtout quelques élèves de Kossel, ont placé, comme des produits de décomposition très importants, les acides diamidés lysine et ornithine, avec l'arginine, qui s'y rattache, ainsi qu'une base d'une composition jusqu'ici inconnue: l'histidine. D'ailleurs, la belle méthode récemment indiquée par E. Fischer¹⁾ pour la séparation des acides amidés par voie de distillation fractionnée de leurs éthers, effectuée dans le vide, a déjà, dans plusieurs cas, soutenu l'épreuve et promet la découverte de nouveaux produits de décomposition, inconnus jusqu'ici, de la classe des acides amidés.

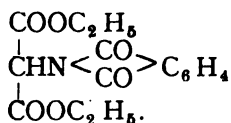
Comme de nouveaux produits de décomposition ne s'obtiennent en général que par quantités extrêmement faibles et souvent à grand'peine, il importe pour une étude tant soit peu approfondie que les recherches synthétiques marchent de pair avec les analytiques, soit qu'on se propose d'isoler et identifier de nouveaux produits de décomposition, soit qu'on vise à former

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 433 (1901), et XXXV, 2162 (1902).

des combinaisons encore plus compliquées, en prenant ces produits-là pour point de départ. Par conséquent, il serait d'une assez grande importance de pouvoir arriver à préparer par synthèse, sans trop de difficulté et avec un rendement satisfaisant, ces combinaisons si importantes pour l'étude des protéines, tant celles qu'on a déjà trouvées parmi les produits de décomposition que celles qui y sont apparentées.

C'est en partant de considérations de ce genre que j'ai élaboré la méthode que je vais décrire pour la préparation des acides α -amidés. Voilà aussi pourquoi je n'ai voulu me contenter de pouvoir préparer à l'état de pureté les combinaisons dont il s'agit; au contraire, j'ai varié les procédés particuliers en vue de découvrir la voie à suivre pour obtenir le meilleur rendement, et pour faciliter l'emploi de ma méthode, j'ai compris dans la description de celle-ci tous les détails de quelque importance. La méthode en question, applicable à la préparation d'un très grand nombre d'acides α -amidés (et presque tous les acides amidés obtenus jusqu'ici par la décomposition des protéines appartiennent à cette classe), est fondée sur les belles synthèses effectuées par S. Gabriel au moyen du phtalimide potassique.

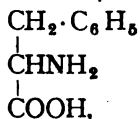
L'éther malonique est transformé, d'après Knoevenagel¹⁾, en éther monobromomalonique qui, traité convenablement par le phtalimide potassique, donne l'éther phtalimidomalonique:



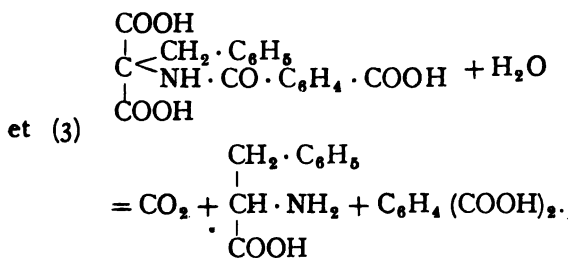
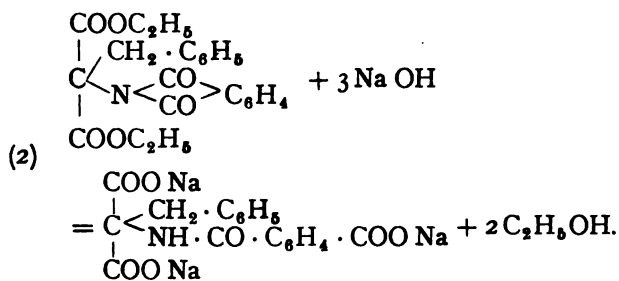
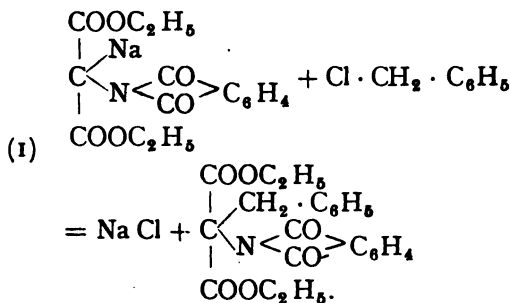
Cette combinaison, qu'on peut obtenir à l'état pur avec un rendement égal à plus de 80% de celui donné par le calcul, sert de point de départ pour la préparation des acides α -amidés, la combinaison sodique traitée par un composé haloïde convenable donnant un produit qui, porté à l'ébullition avec de l'acide chlorhydrique ou, ce qui d'ordinaire est préférable, quand on le traite d'abord par une solution d'hydroxyde de sodium et puis l'évapore avec de l'acide chlorhydrique, fournit le chlorhydrate de l'acide amidé désiré.

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXI, 1355 (1888).

Dans le cas des acides monoamidés monobasiques j'ai choisi à titre d'exemple la phénylalanine:

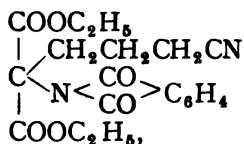


dans la préparation de laquelle on a employé comme combinaison halogénée le chlorure de benzyle, d'après les équations que voici:

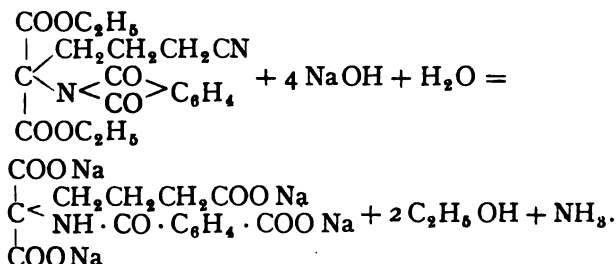


On voit aisément que, si l'on se sert d'autres combinaisons d'halogène, on aura des acides amidés différents; c'est ainsi que, par exemple, les 4 bromures de butyle donneront 4 acides α -amino-caproïques isomères, dont on n'a préparé jusqu'ici que 2, à savoir l'acide α -aminocaproïque normal et l'acide α -amino-isobutyle-acétique.

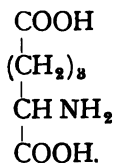
Pour les acides monoamidés bibasiques, j'ai choisi mon exemple dans l'acide α -aminoadipique inconnu jusqu'ici et dont la composition est analogue à celles des acides asparaginique et glutaminique. Pour la préparation de cet acide nouveau je me suis servi du γ -chlorbutyronitrile: $\text{Cl CH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CN}$, qu'on peut préparer facilement par la méthode de S. Gabriel¹⁾. Le phtalimidosodomalonate d'éthyle m'a alors donné l'éther butyronitrile-phtalimidomalonique :



qui, traité par une solution d'hydroxyde de sodium, s'est décomposé comme suit:



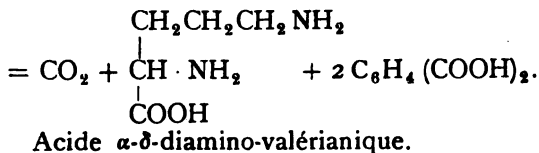
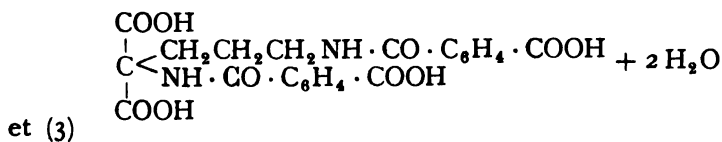
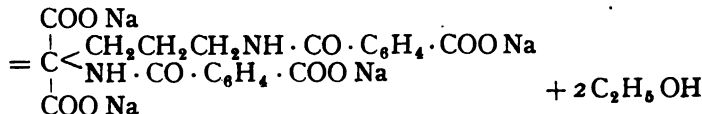
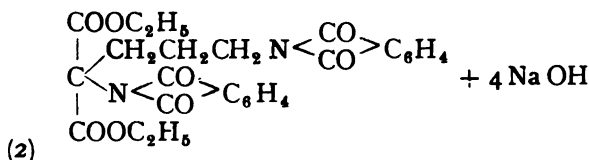
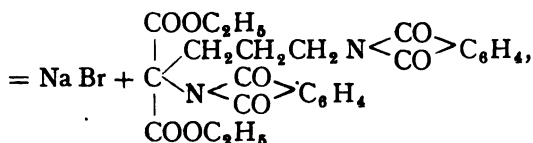
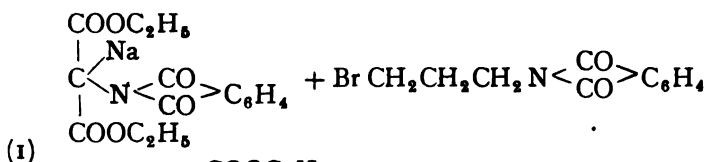
Enfin, j'ai fait évaporer avec de l'acide chlorhydrique l'acide tétrabasique formé et qui par ce dernier traitement s'est décomposé en dégageant de l'acide carbonique, déposant de l'acide phtalique et formant le chlorhydrate de l'acide α -aminoadipique:



Il est évident que l'emploi de l'éther chloracétique: $\text{Cl CH}_2 \text{COOC}_2\text{H}_5$, donnera finalement l'acide asparaginique, de même que — dans des conditions convenables, afin d'empêcher l'élimination de l'hydrure d'halogène — l'éther β -chloropropionique donnera l'acide glutaminique.

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXIII, 1771 (1890).

Enfin, comme exemple d'un acide diamidé, j'ai choisi l'acide α - δ -diaminovalérique, qui est vraisemblablement la forme racémique de l'ornithine de Jaffé¹⁾. La combinaison halogénée employée pour cette synthèse, était le γ -bromopropylphthalimide: $\text{Br CH}_2 \text{ CH}_2 \text{ CH}_2 \text{ N} \begin{smallmatrix} \text{CO} \\ \diagup \diagdown \\ \text{CO} \end{smallmatrix} \text{C}_6\text{H}_4$, facile à obtenir par le procédé de J. Weiner²⁾, et voici par quelles opérations on arriva à préparer le susdit acide:



Quant à la préparation de l'acide α - ϵ -diaminocaproïque et l'acide diaminoacétique, on voudra bien se reporter au chapitre qui termine ce mémoire.

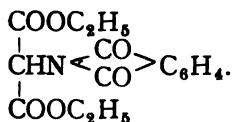
Le plan de ce travail a été dressé et l'ouvrage commencé

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. X, 1925 (1877).

²⁾ Ibid. XXI, 2671 (1888).

durant le printemps de 1901 sans que je connusse alors les synthèses des acides gras diamidés de M. E. Fischer¹⁾, dont la première partie avait déjà été présentée, en décembre 1900, à l'Académie de Berlin; il convient donc d'ajouter qu'avant de poursuivre mes études synthétiques sur les acides diamidés j'étais en correspondance avec M. E. Fischer.

I. Éther phtalimidomalonique:



1. Préparation et propriétés

A 2 mol. gr. (320 gr.) d'éther malonique j'ai ajouté goutte à goutte (d'abord lentement, jusqu'à ce que la réaction eût commencé, puis plus vite) un peu plus de 4 at. gr. de brome (104 cc., soit environ 330 gr.). L'opération, pratiquée à la température ambiante, se faisait dans un matras de la capacité de 2 l. et muni d'un tube réfrigérant à reflux, de la partie supérieure duquel le bromure d'hydrogène développé par la réaction était amené dans un flacon contenant de l'eau. Ayant ajouté goutte à goutte le brome, j'ai chauffé le matras pour en chasser le bromure d'hydrogène, d'abord au bain-marie, et puis dans le bain d'huile en même temps que dans le vide, jusqu'à ce que le contenu se mît à bouillir violemment. Le rendement obtenu en éther monobromomalonique répondit au calcul.

Pour traiter par le phtalimide potassique j'ai réparti uniformément dans cinq matras de 2 l. de capacité le dérivé bromé obtenu, et à chaque portion j'ai ajouté un peu plus de $\frac{2}{5}$ mol. gr. de phtalimide potassique (80 gr. au lieu de 74 gr.). Après l'avoir fortement agité, j'ai mis le flacon dans le bain-d'huile et porté à 100—120° jusqu'à l'apparition de signes d'un commencement de réaction (fusion de la masse,

¹⁾ Synthese der α - δ -Diaminoveriersäure: Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 454 (1901), Synthese der α - γ -Diaminobuttersäure: ibid. XXXIV, 2900 (1901), et E. Fischer & F. Weigert: Synthese der α - ϵ -Diaminocaprinsäure: Sitzungsber. der Berliner Akademie 1902, p. 270.

génération de vapeur). Alors, afin d'empêcher une trop grande élévation de température et une réaction trop violente, j'ai enlevé le matras du bain d'huile et, le matras ayant été agité à plusieurs reprises, l'opération s'est continuée sans afflux de chaleur du dehors. Lorsque la réaction parut terminée, ce que je pus facilement reconnaître à ce que le phtalimide potassique lamellaire était remplacé par le bromure de potassium granulé, j'ai chauffé, pour plus de sûreté, dans le bain d'huile pendant $\frac{1}{2}$ heure environ, à une température de $130-140^{\circ}$. Après un refroidissement convenable, j'ai traité par l'eau au bain-marie l'ensemble des ingrédients et, de la sorte, fait dissoudre le bromure de potassium et l'excès de phtalimide potassique, tandis que l'éther phtalimidomalonique fondit et se laissa facilement, par l'eau chaude, entraîner hors du matras. Retiré des cinq matras, le produit total de la réaction est resté deux heures couvert par la solution aqueuse de bromure de potassium, et par là s'est complètement pris en une masse solide. Pulvérisée, cette masse s'est laissée, sans difficulté, débarrasser de son brome par un lavage à l'eau froide. — Le rendement en éther phtalimidomalonique brut et séché à l'air, répondait presque au calcul (soit environ 590 gr. au lieu de 610 gr.).

Pour purifier le produit brut, qui était de couleur jaunâtre ou jaune-grisâtre et contenait toujours une petite dose de phtalimide, j'ai traité la matière séchée à l'air par environ 500 cc. de benzole, où l'éther phtalimidomalonique s'est dissous, tandis que la partie de beaucoup prépondérante du phtalimide est restée non dissoute. J'ai séparé ce reste en filtrant, et l'ai lavé avec 3×40 cc. de benzole; son poids à l'état sec était d'environ 40 gr. De la solution obtenue j'ai distillé le benzole, ce qui a laissé l'éther phtalimidomalonique sous forme d'huile jaunâtre, qui par le refroidissement s'est pris en une masse cristalline et qui, se dissolvant en 500—600 cc. d'alcool, a donné un liquide parfaitement clair. Le refroidissement de la solution alcoolique, produit en dernier lieu à l'aide d'eau glacée, a fait déposer l'éther phtalimidomalonique sous forme d'une belle masse cristalline blanche, où le microscope faisait voir surtout des prismes assez irréguliers et obliquement tronqués. J'ai filtré à l'aspirateur, et le produit, 3 fois lavé avec soin à l'alcool, est ainsi devenu parfaitement pur. Le rendement s'éleva à environ 400 gr.; mais de l'eau-mère et de l'alcool qui avait servi au la-

vage; je pus tirer, en chassant la majeure partie de l'alcool, puis refroidissant, un second produit, suivi d'un troisième produit obtenu d'une manière analogue. Leur poids total était d'environ 100 gr., de sorte que le rendement total de matière cristallisée de nouveau s'est élevé à plus de 80% de celui donné par le calcul. D'une part, le produit principal se montra toujours parfaitement pur; mais, de leur côté, les produits tirés de l'eau-mère contenaient ordinairement de très petites quantités de phtalimide, qu'on pouvait reconnaître soit par le dosage de l'azote (savoir de 4,67 à 4,71 % d'azote au lieu de 4,59 %), soit en déterminant le point de fusion; en faisant dissoudre dans le benzole et traitant comme on l'a fait plus haut, on pouvait évidemment en obtenir aussi un produit tout à fait pur.

L'analyse de préparations pures à l'état sec a donné les résultats que voici:

En dosant la quantité d'azote (opération pour laquelle ici comme dans tous les dosages d'azote dont parle ce mémoire, on a employé la méthode de Kjeldahl), 0,3507 grammes de la préparation A ont donné une quantité d'ammoniaque qui répondait à 16,38 centimètres cubes d'une solution d'hyposulfite ($0,9815 \times \frac{1}{14}$) (4,58% d'azote).

0^{gr},3690 de la préparation B équivalaient à 17^{cc},18 de la même solution d'hyposulfite (4,57% d'azote).

0^{gr},4259 de la préparation C équivalaient à 19^{cc},62 d'une solution d'hyposulfite (norm. au $\frac{1}{14}$) (4,61% d'azote).

0^{gr},3548 de la préparation D correspondaient à 16^{cc},30 de cette même solution (4,59% d'azote).

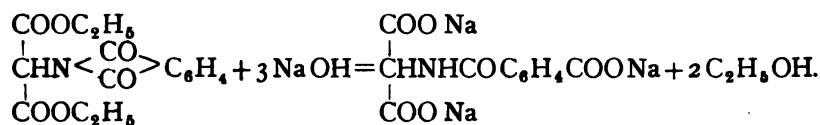
0^{gr},1907 de la préparation A ont donné 0^{gr},0824 d'eau (4,80% d'hydrogène) et 0^{gr},4114 d'acide carbonique (58,84% de carbone).

		Calculé	Trouvé				
C ₁₅	180	59.02	58.84				
H ₁₅	15	4.92	4.80				
O ₆	96	31.47					
N	14	4.59	4.58	4.57	4.61	4.59	
	305	100.00					

A l'état pur, l'éther phtalimidomalonique fond entre 73° 8 et 74° 0 (appareil de Roth). Cette substance se dissout très facilement dans le benzole, le chloroforme, l'éther acétique, l'acétone et l'alcool chaud; elle est un peu moins soluble dans le sulfure de carbone et dans l'éther; elle est assez peu soluble dans l'alcool froid, et elle se dissout très difficilement dans l'éther de pétrole et dans l'eau chaude; dans l'eau froide elle est insoluble.

Je vais terminer par quelques remarques relatives au procédé ci-dessus décrit pour la préparation de l'éther phtalimidomalonique pur. La principale impureté du produit brut étant le phtalimide, substance beaucoup moins soluble dans l'alcool chaud que l'éther phtalimidomalonique, on pourrait épurer celui-ci en traitant la matière brute par une quantité convenable d'alcool chaud, qui laisserait la plus grande partie du phtalimide non dissoute. Cependant cette opération ne mène pas au but; car en refroidissant la solution alcoolique, du phtalimide cristallise avec l'éther phtalimidomalonique, et l'on a beau renouveler la cristallisation de l'alcool, on ne peut pas abaisser la quantité d'azote notablement (4,85—4,90% d'azote). Dans un seul cas la recristallisation peut donner un produit parfaitement pur: quand la teneur de la masse en phtalimide est extrêmement petite, comme cela arrive par exemple quand on a traité le produit brut par le benzole d'après le procédé ci-dessus décrit; car alors tout le phtalimide reste dans l'eau-mère alcoolique.

On pourrait aussi chercher à éliminer le phtalimide de l'éther phtalimidomalonique en le traitant par une solution d'hydroxyde de sodium, le phtalimide se dissolvant facilement par ce liquide; cependant il est impossible d'opérer cette séparation; car, lui aussi, l'éther phtalimidomalonique se dissout avec une facilité extrême dans une solution même étendue d'hydroxyde de sodium, et cela à la température ambiante et d'après l'équation suivante:



En sursaturant légèrement d'acide chlorhydrique la solution obtenue, on fait précipiter l'acide tribasique correspondant:

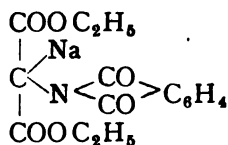


COO H , qui n'est guère soluble dans l'eau. M. Jessen-Hansen, qui dans notre laboratoire s'occupe des synthèses des acides guanidés, a également rattaché à ces études celle de l'influence de la cyanamide sur cet acide et quelques-uns de ses dérivés. On trouvera donc dans un mémoire qui, on l'espère, ne tardera pas à sortir de ses mains, une description plus approfondie de cet acide et de ces propriétés.

Au moins la plus grande partie du phtalimide présent dans le produit brut, provenait de ce que l'éther bromomalonique contenait encore du bromure d'hydrogène; on pouvait donc en conclure que la préparation en question se ferait plus facilement si l'on distillait dans le vide l'éther bromomalonique avant de s'en servir. Or, on a constaté qu'à l'état brut l'éther phtalimido-malonique qu'on pouvait obtenir en employant l'éther bromo-malonique distillé ne contenait qu'un peu de phtalimide; mais, comme il fut également impossible d'obtenir un produit parfaitement exempt de phtalimide en traitant ce produit brut par une simple recrystallisation dans l'alcool (la teneur en azote était de 4,66%) et que, de plus, on ne pouvait éviter une perte en distillant l'éther bromomalonique, j'ai préféré la méthode précédemment décrite.

A l'état pur, préparé comme on l'a décrit plus haut, l'éther phtalimidomalonique a été lancé dans le commerce par C.-A.-F. Kahlbaum, de Berlin, au prix de 16 Reichsmark les 100 grammes.

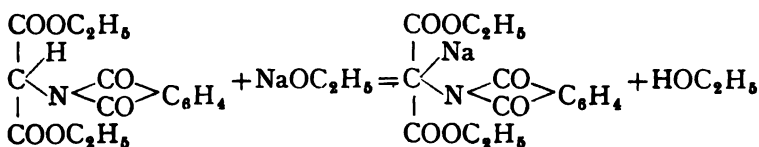
2. Éther phtalimidosodomalonique:



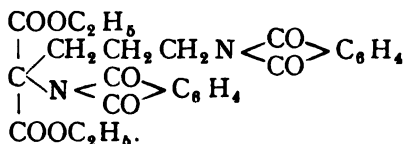
Ayant choisi un ballon de $\frac{1}{2}$ l. muni d'un réfrigérateur à reflux, dont l'extrémité supérieure porte un tube en U contenant du chlorure de calcium, on y dissout $\frac{1}{8}$ at. gr. (4 gr.,6) de sodium brillant dans 80—100. cent. cub. d'alcool absolu récemment distillé. La quantité totale de sodium étant dissoute, et la solution ayant encore une température de 60—70°, on y ajouta un peu plus de $\frac{1}{8}$ mol. gr. d'éther phtalimido-malonique (63 gr. au lieu de 61 gr.). En agitant avec précaution, et chauffant un peu au besoin, on obtint la dissolution de tout l'éther phtalimidomalonique, et le liquide brun jaunâtre ainsi obtenu ne tarda pas à déposer le phtalimidosodomalonnate d'éthyle sous forme de poudre jaune à gros cristaux. (Il est plus avantageux que la totalité de l'éther phtalimidomalonique soit dissoute avant que le composé de soude commence à se déposer; car autrement on risque de voir une partie de l'éther

phtalimidomalonique englobée dans la combinaison de sodium et soustraite de la sorte à l'action de l'alcoolat sodique.) La combinaison de sodium s'étant déposée, on avait une bouillie épaisse, d'où l'alcool était complètement éliminé par distillation dans le vide, en même temps que l'air pur et sec affluait au-dessus de la masse, mais pas à travers elle. On chauffait dans le bain d'huile, et au début on eut à procéder avec beaucoup de précaution pour empêcher une ébullition trop active; car la masse avait une tendance aux soubresauts; mais à la fin la température du bain se trouva entre 130 et 140°, et l'on jugea à propos d'écarter les dernières traces d'alcool en suspendant à plusieurs reprises l'aspiration et en insufflant dans le ballon de l'air sec et pur, puis en faisant de nouveau le vide. Sèche, la combinaison de sodium se présentait jaunâtre à éclat rougeâtre. En pesant le ballon, on pouvait contrôler la disparition de tout l'alcool.

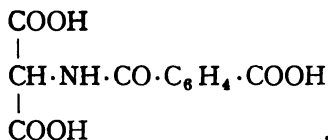
A l'état sec et exempt d'alcool, l'éther phtalimidosodomalonique fut aussitôt traité par la combinaison d'halogène en question, et me procura dans tous les cas que j'ai étudiés la réaction telle que je la désirais; mais il n'en fut pas ainsi quand j'ajoutais la combinaison d'halogène avant de distiller l'alcool, ou bien quand j'entreprenais de faire la réaction dans une solution alcoolique. La raison doit certainement en être que la transformation



est réciproque et n'a lieu complètement de gauche à droite que quand l'alcool est écarté par la distillation. Dans les premières expériences que j'ai faites, je ne connaissais pas encore cet état de choses, et c'est pourquoi je laissais la réaction se produire dans le liquide alcoolique; la combinaison d'halogène employée était le γ -bromopropylphtalimide, et comme produit de la réaction je m'étais en conséquence attendu à obtenir l'éther phtalimido- γ -phtalimidopropylmalonique décrit plus loin (voir page 34).



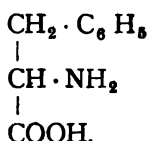
Toutefois on n'a pu isoler de la masse engendrée par cette réaction qu'environ 40% de la quantité à laquelle on avait estimé cette combinaison; le reste constituait une huile qu'on ne réussit pas à faire cristalliser et qui consistait probablement en un mélange d'éther phtalimidomalonique non transformé et de la combinaison $C_2H_5OCH_2CH_2CH_2N\langle\begin{smallmatrix} CO \\ CO \end{smallmatrix}\rangle C_6H_4$, due à l'action de l'alcoolat de sodium sur le γ -bromopropylphtalimide, car le dédoublement par l'acide chlorhydrique donnait de la glycine (pesée et analysée sous forme d'acide hippurique) en proportion répondant approximativement à ce qu'on aurait pu attendre si l'huile avait contenu à l'état non transformé env. 60% de la quantité employée d'éther phtalimidomalonique. Dans une autre expérience la réaction se produisit entre l'éther phtalimidomalonique et le γ -bromopropylphtalimide en présence d'un excès notablement fort d'alcool (on employa $1/10$ mol. gr. des substances en question, soit la moitié des doses précitées et 300 cc. d'alcool); mais aussi le rendement se borna à 4—5 gr. d'éther phtalimido- γ -propylphtalimidomalonique, soit seulement env. 10% de la quantité calculée; le reste consistait en une huile qui sans doute contenait de l'éther phtalimidomalonique non transformé; car, traité par une solution d'hydroxyde de soude, et puis par l'acide chlorhydrique, il fournit une abondante quantité (qui pourtant ne répondait pas tout à fait au calcul) de l'acide tribasique susmentionné (p. 9):



L'autre élément de l'huile consiste-t-il réellement dans la combinaison $C_2H_5O \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot N\langle\begin{smallmatrix} CO \\ CO \end{smallmatrix}\rangle C_6H_4$? je n'en ai fourni aucune preuve, mais les vraisemblances vont dans ce sens.

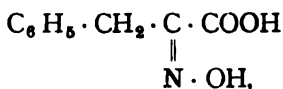
Parmi les nombreuses synthèses ayant pour point de départ l'éther malonique et effectuées sans production d'éther sodomalonique exempt d'alcool, on en trouve beaucoup qui sont loin de donner un rendement satisfaisant, et il est très probable qu'on pourrait modifier le résultat en effectuant la réaction sans alcool.

II. Phénylalanine :



Ce furent E. Schulze et J. Barbieri¹⁾ qui les premiers obtinrent la phénylalanine de germes de lupin étiolés, et tous les deux presque simultanément²⁾ en prouvèrent l'existence parmi les produits de la décomposition d'une substance protéique tirée de graines de citrouille, produits obtenus par ébullition avec l'étain et l'acide chlorhydrique. Voici quelque deux ans que, recourant au procédé Fischer³⁾ pour séparer les produits du dédoublement des protéines en fractionnant dans le vide les divers éthers, E. Fischer et ses collaborateurs ont signalé la phénylalanine comme produit constant de la décomposition de nombreuses et différentes substances protéiques⁴⁾ et par là appelé l'attention sur la place éminente occupée par la phénylalanine dans l'étude des substances protéiques.

La phénylalanine racémique fut déjà en 1882 préparée synthétiquement par E. Erlenmeyer et A. Lipp⁵⁾, qui prirent pour point de départ la phénylaldéhyde. Plus tard J. Plöchl⁶⁾ en fit autant en partant du produit de la condensation de l'acide hippurique et de la benzaldéhyde et profitant d'une réaction dont l'explication claire et complète est due aux travaux tout récents de E. Erlenmeyer jeune et J. Kunlin⁷⁾. Enfin, E. Erlenmeyer jeune⁸⁾ a préparé la phénylalanine soit en réduisant l'oxime de l'acide phénylpyruvique :



¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XII, 1924 (1879), XIV, 1785 (1881), et Journ. pr. Chem. [2] XXVII, 337 (1883).

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XVI, 1711 (1883).

³⁾ ibid. XXXIV, 433 (1901).

⁴⁾ Zeitschr. physiol. Chem. XXXIII, 151 (1901), XXXIII, 177 (1901), XXXIII, 412 (1901), XXXV, 70 (1902), et XXXVI, 268 (1902).

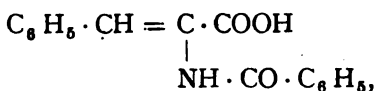
⁵⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XV, 1006 (1882), et Liebigs Ann. CCXIX, 187 (1883).

⁶⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XVII, 1623 (1884).

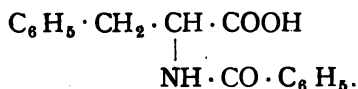
⁷⁾ Liebigs Ann. CCCVII, 146 (1899).

⁸⁾ ibid. CCLXXI, 169 (1892), et CCLXXV, 17 (1893).

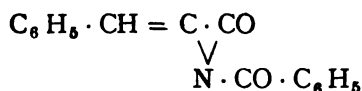
soit en réduisant l'acide benzoylaminocinnamique



et dédoublant par l'acide chlorhydrique la benzoyle-phénylalanine formée :

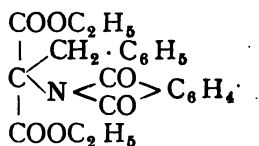


Comme l'acide benzoylaminocinnamique est assez facile à obtenir par la condensation de l'acide hippurique avec la benzaldéhyde en présence de l'acétate de soude et de l'acide acétique anhydre, si l'on dissout le produit de cette condensation :



dans une solution d'hydroxyde de soude, et qu'ensuite on précipite par l'acide chlorhydrique, — ce dernier moyen constitue le plus commode des procédés jusqu'ici connus pour préparer la phénylalanine racémique, et E. Fischer et A. Mouneyrat¹⁾ s'en sont servis avec avantage en dédoublant la benzoyle-phénylalanine racémique en ses composants actifs. Cependant le procédé ci-dessous décrit, déjà esquissé dans l'introduction à ce mémoire, donne un excellent rendement et me paraît tout aussi simple, depuis que l'éther phtalimidomalonique est devenu article de commerce.

1. Éther benzylphtalimidomalonique :



Dans un ballon d' $\frac{1}{2}$ l. muni d'un tube réfrigérant à reflux, au haut duquel était installé un tube en U chargé de chlorure de calcium, on traita dans le bain d'huile et entre 150 et

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIII, 2383 (1900).

160°¹⁾ $\frac{1}{8}$ mol. gr. d'éther phtalimidosodomalonique (voir p. 10) par 40 gr. de chlorure de benzyle (calculé 25^{gr},3). Au bout de deux heures de chauffage, la réaction était assez avancée pour qu'on pût réduire en morceaux en l'agitant la croûte de composé sodique, et quand on eut chauffé pendant 6 heures en répétant l'agitation, on vit le tout former une masse presque gélatineuse, assez pâteuse et mêlée de chlorure de sodium, qui n'avait plus de réaction alcaline sur le papier curcuma humide. L'excès de chlorure de benzyle fut ensuite séparé par distillation à la vapeur, et le résidu, huile jaune, fut mêlé d'eau chaude et versé dans une capsule, où il ne tarda pas à se figer en cristaux. La masse cristalline, un peu plastique, fut pilée et, une fois bien refroidie, filtrée et purgée de chlore par un lavage à l'eau froide; le rendement en produit séché à l'air répondit au calcul.

Pour purifier le produit brut, on en fit une dissolution dans 200 cc. d'alcool chaud; on en sépara par filtration quelques flocons non dissous, et qu'on lava par 2 X 20 cc. d'alcool chaud. En refroidissant bien la solution alcoolique obtenue, et remuant fréquemment, on fit déposer la matière sous forme de précipité cristallin d'un blanc pur, où le microscope révéla de belles aiguilles incolores, dont quelques-unes étaient assez grandes pour présenter des prismes tétraédriques, parfois combinés avec une pyramide quadrangulaire²⁾. La masse cristalline fut filtrée à l'aspirateur, puis trois fois lavée par aspiration avec une quantité totale de 200 cc. d'alcool refroidi à la glace. Le rendement du premier produit fut d'environ 56 gr.; mais après avoir enlevé par distillation la majeure partie de l'alcool, on put encore retirer de l'eau-mère et de la rinçure alcoolique 7 à 8 gr., ce qui porta le rendement total à près de 80% du calculé; des expériences où j'ai opéré à mi-dose, m'ont pourtant rendu un peu moins, soit 70—75% du produit calculé.

Voici le résultat de l'analyse des préparations séchées à l'air:

0^{gr},5269 de la préparation A (premier produit) donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 18^{cc},44 d'une solution d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (3,50% d'azote).

¹⁾ La réaction se manifeste déjà entre 135 et 140° dans le bain d'huile, mais elle est assez lente.

²⁾ Recristallisé dans une grande quantité d'alcool lentement refroidi, le composé se déposa sous forme de beaux prismes tétraédriques et à 4 pans, ordinairement obliquement tronqués.

0^{gr},3710 de la préparation B (premier produit) répondaient à 12^{cc},85 de la même solution d'hyposulfite (3,46 % d'azote).

0^{gr},4350 de la préparation C (second produit) répondaient à 15^{cc},00 de cette même solution (3,45 % d'azote).

0^{gr},2090 de la préparation B donnèrent 0^{gr},0981 d'eau (5,22 % d'hydrogène) et 0^{gr},5108 d'acide carbonique (66,65 % de carbone).

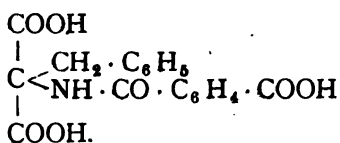
		Calculé	Trouvé		
C ₂₂	264	66,84	66,65		
H ₂₁	21	5,32	5,22		
O ₆	96	24,30			
N	14	3,54	3,50	3,46	3,45
	395	100,00			

Dans l'appareil Roth l'éther benzylphthalimidomalonique fond entre 105 et 106°; mais il se contracte déjà à quelques degrés au-dessous. Le composé est très soluble dans le chloroforme, le benzol et l'alcool chaud, assez soluble dans l'éther, peu soluble dans l'alcool froid et l'éther pétroléique chaud, très peu soluble dans cet éther froid, presque insoluble dans l'eau chaude, et insoluble dans l'eau froide.

Si l'on traite l'éther benzylphthalimidomalonique par une forte dose d'acide chlorhydrique ou de bromure d'hydrogène, la combinaison se dissoudra petit à petit en se dédoublant; mais la dissolution est très lente, surtout à une température assez haute pour fondre l'éther. Le dédoublement se produit beaucoup plus aisément si, scindant l'opération, l'on commence par traiter la combinaison par une solution d'hydroxyde de sodium, qui la transforme en sel de soude de l'acide phthalamique-benzylmalonique tribasique, et qu'ensuite on dédouble cet acide en le chauffant avec de l'acide chlorhydrique (voir les réactions p. 3). Ces deux transformations se produisent avec une extrême facilité, et quand on prépare la phénylalanine, il n'est pas nécessaire de préparer à l'état de pureté le susdit acide tribasique, qui est presque insoluble dans l'acide chlorhydrique faible, mais est au contraire assez soluble dans l'eau froide. Il suffit parfaitement de précipiter, par un léger excès d'acide chlorhydrique, l'acide tribasique de la solution obtenue en traitant par une lessive de soude l'éther benzylphthalimidomalonique, après quoi l'on fait avec l'aspirateur plusieurs lavages à l'acide chlorhydrique étendu, et le purge ainsi de son sel de cuisine. De la sorte on ne perd pour ainsi dire rien et, terminant par un bain d'eau,

l'on décompose l'acide par l'acide chlorhydrique étendu (voir d'ailleurs ce qui se passe durant la préparation de la phénylalanine, p. 19).

2. Acide phtalamique-benzylmalonique tribasique:



Pour le préparer à l'état pur, on a traité $\frac{1}{30}$ mol. gr. (19^{gr},7) d'éther benzyl-phtalimidomalonique par 50 cc. de lessive de soude 5-norm., au bain-marie, dans un petit matras conique. Ayant chauffé durant 1 heure ou 1 $\frac{1}{2}$, on constata le dédoublement complet de la combinaison primitive et, au lieu de la masse volumineuse de l'éther employé, on trouva un précipité granulé cristallin du sel sodique de l'acide, précipité peu soluble dans la solution concentrée d'hydroxyde de sodium, mais assez soluble dans l'eau. Il était donc aisé de décider si la réaction était terminée ou non; pour cela, il suffisait d'essayer si un échantillon dudit précipité donnait dans l'eau une solution claire ou louche. La transformation achevée, on refroidit, en terminant à l'eau de glace, après quoi on ajouta de la glace et neutralisa par l'acide chlorhydrique norm. frappé; puis on enleva par filtration les flocons non dissous. Le liquide fut refroidi à la glace en remuant, et précipité en y versant petit à petit 50 cc. d'acide chlorhydrique 5-normal frappé à la glace; puis on ajouta encore 50 cc. d'acide chlorhydrique concentré. Grâce à cette opération la majeure partie de l'acide en question se déposa sous la forme d'une masse huileuse qui, séjournant dans l'eau-mère et refroidie à l'eau de glace durant deux heures, se figea en cristaux. En même temps une petite quantité se déposa dans l'eau-mère sous forme de cristaux aciculés, où un fort grossissement fit voir des prismes à 4 pans bien développés. On mit la croûte cristalline dans un mortier et la pulvérisa; le produit fut filtré et délivré de son sel de cuisine par un quintuple lavage à l'aspirateur avec de l'acide chlorhydrique 2-norm., ce qui n'emporta que très peu de l'acide; maintenant l'acide put servir directement à préparer la phénylalanine (voir p. 19); il va de soi qu'en préparant l'acide pur on

dut le laver ultérieurement à l'eau frappée pour lui enlever l'acide chlorhydrique. On obtint 13^{gr},7 d'acide séché à l'air; mais le liquide de lavage (env. 400 cc.) traité par 130 cc. d'acide chlorhydrique concentré et refroidi à la glace, donna un second produit qui, dûment lavé à l'eau, devint pur et qui, séché à l'air, pesait 1^{gr},0; le rendement total fut donc 82 % du calculé.

Voici le résultat de l'analyse des préparations séchées à l'air:

0^{gr},3053 de la préparation A (premier produit) donnèrent par le dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 12^{cc},05 d'une solution d'hyposulfite de sodium norm. au $\frac{1}{14}$ (3,95 % d'azote).

0^{gr},2334 de la préparation B (premier produit) répondaient à 9^{cc},15 de cette solution (3,92 % d'azote).

0^{gr},3505 de la préparation C (second produit) répondaient à 13^{cc},75 de cette même solution (3,92 % d'azote).

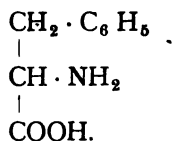
0^{gr},1931 de la préparation A donnèrent 0^{gr},0738 d'eau (4,25 % d'hydrogène) et 0^{gr},4294 d'acide carbonique (60,64 % de carbone).

		Calculé	Trouvé		
C ₁₈	216	60,50	60,64		
H ₁₈	15	4,20	4,25		
O ₇	112	31,38			
N	14	3,92	3,95	3,92	3,92
	357	100,00			

Enfin, 0^{gr},1903 de la préparation B, titrés par de la phénolphtaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), en exigèrent 16^{cc},00; calculé à 16^{cc},06.

Chauffé rapidement dans un tube capillaire au bain de glycérine¹⁾, l'acide fond en dégageant de l'air entre 160° et 165°.

3. Phénylalanine:



0^{mol} ^{gr},1 (39^{gr},5) d'éther benzyl-phtalimidomalonique ayant été transformé par le procédé ci-dessus (voir p. 17) en acide

¹⁾ Ici comme dans les cas suivants, cette opération comprend un chauffage, qui tient durant quelques instants, à une vingtaine de degrés au-dessous du point de fusion, puis une élévation de température d'env. 10° par minute.

phtalamique-benzylmalonique tribasique, qu'on lave d'abord avec de l'acide chlorhydrique 2-normal, et ensuite avec le jet d'une pissette on fait passer le précipité dans un ballon (de 1½ litre), en employant env. ½ l. d'eau; on y ajoute 50 cc. d'acide chlorhydrique concentré. On place le ballon au bain-marie bouillant, et obtient peu à peu, avec dégagement d'acide carbonique, une solution parfaitement claire. Quand on a chauffé pendant deux heures, on ajoute 300 cc. d'acide chlorhydrique concentré, qui ne produisent plus de précipité, et l'on poursuit le chauffage durant une heure pour parfaire la réaction. Puis le liquide est évaporé dans une capsule en porcelaine au bain-marie jusqu'à consistance d'une bouillie assez épaisse. On refroidit à l'eau de glace, puis extrait du produit obtenu le chlorhydrate de phénylalanine, par une quantité aussi faible que possible d'eau refroidie à zéro. L'acide phtalique qui restait subit alors un quintuple lavage avec une quantité d'eau à la glace mesurant 150 cc. en tout, ce qui le laissait presque absolument exempt de chlore et lui donnait à l'état sec un poids de 14 gr. (env. 84 % des 16^{gr},6 calculés). La solution de phénylalanine chlorhydrique ayant été additionnée de 60 cc. d'eau ammoniacale 5-normale, en rendait manifestement l'odeur. Évaporé dans une large¹⁾ capsule de porcelaine, elle passa à l'état de bouillie épaisse, qu'on refroidit, puis traite par 100 cc. d'eau frappée à la glace, en écrasant bien les grumeaux qui pourraient s'y présenter. Ayant ainsi fait dissoudre le chlorure d'ammonium, on fit passer sur un filtre la phénylalanine et lava à l'aspirateur avec de l'eau frappée. On en tira 11 gr. de phénylalanine séchée à l'air; mais en évaporant les eaux-mères et traitant le résidu comme ci-dessus, on obtint un second produit qui, sec, pesait env. 3 gr., en sorte que le rendement complet dépassait les 80 % du résultat calculé. La phénylalanine brute était pure à très peu près; on acheva de la purifier en la dissolvant dans l'eau chaude, la débarrassant, chaude encore, d'une trace d'hydroxyde de fer dû à l'acide chlorhydrique employé, puis évaporant le liquide filtré jusqu'à cristallisation. Le refroidissement donna de beaux cristaux de phénylalanine en feuilles fines à éclat soyeux, qu'on sépara par filtration, lava à l'eau froide et qui, séchés à l'air, pesaient 9 gr. L'eau-mère et celle du lavage

¹⁾ Puisque le sel ammoniac grimpe le long des parois.

rendirent encore 3^{gr},5 par une évaporation ultérieure analogue, et le reste put être retiré, bien qu'un peu moins pur, en évaporant à siccité l'eau-mère, ou en précipitant par l'acétate de cuivre la solution de phénylalanine.

L'analyse des préparations séchées à l'air donna le résultat suivant:

0^{gr},2278 de la préparation A (premier produit) donnèrent par le dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque correspondant à 19^{cc},35 d'une solution d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (8,49 % d'azote).

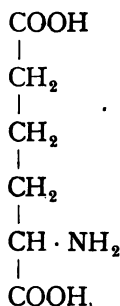
0^{gr},2890 de la préparation B (second produit) répondaient à 24^{cc},50 de la même solution d'hyposulfite (8,48 % d'azote).

0^{gr},1584 de la préparation A donnèrent 0^{gr},0935 d'eau (6,56 % d'hydrogène) et 0^{gr},3805 d'acide carbonique (65,51 % de carbone).

		Calculé	Trouvé	
C ₉	108	65,45	65,51	
H ₁₁	11	6,67	6,56	
O ₂	32	19,39		
N	14	8,49	8,49	8,48
<hr/>				
	165	100,00		

Chauffés rapidement dans des tubes capillaires, les deux produits ci-dessus, après s'être contractés, fondirent un peu au-dessus de 270° (corr.) (entre 271 et 273°), en dégageant beaucoup d'air.

III. Acide α -aminoadipique:



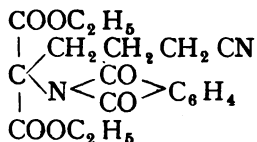
Dans un des travaux sur les décompositions des protéines par lesquels il a ouvert la voie, A. Kossel¹⁾ englobe dans la

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. XXV, 175 (1898).

dénomination commune d'*hexones* les quatre produits importants de ces décompositions ayant six atomes de carbone en une molécule: leucine ($C_6 H_{13} NO_2$), lysine ($C_6 H_{14} N_2 O_2$), histidine ($C_6 H_9 N_3 O_2$) et arginine ($C_6 H_{14} N_4 O_2$), et désigne du terme commun de *bases hexoniques* les trois dernières de ces substances (arginine, histidine et lysine), dont le caractère basique est prononcé. Kossel assigne à ces hexones, parmi les produits de la décomposition des protéines, une place importante analogue à celle qu'occupent les hexoses parmi les produits du dédoublement des polysaccharides, et il établit certains parallèles très justes entre les substances protéiques et les hexones d'une part, et les polysaccharides et les hexoses d'autre part. En terminant, il fait aussi remarquer combien il serait intéressant de pouvoir prouver qu'à l'instar des hexoses, les hexones renferment six atomes de carbone liés entre eux par séries. Sur ce dernier point cependant, il me semble que les hexones et hexoses se ressemblent peu; car ni la leucine ni l'arginine n'ont six atomes combinés entre eux par série; la constitution de l'histidine est tout à fait inconnue, et la lysine seule peut être supposée avoir ses atomes de carbone disposés comme dans les hexoses. Abstraction faite de cela, je ne sache pas qu'en somme on ait donné une preuve solide que dans les produits de la décomposition des protéines les atomes de carbone présenteraient des combinaisons par séries de six. C'est ainsi que, si d'une part la leucine (acide α -aminoisobutylacétique) se trouve, comme nous l'avons vu plus haut, parmi les plus importants produits de la décomposition protéique, l'acide aminocaproïque normal n'a jamais encore été découvert en dédoublant les substances protéiques, et tandis que les acides asparaginique et glutaminique appartiennent aux produits de décomposition les plus fréquemment rencontrés et connus depuis le plus longtemps, on ignore complètement l'acide α -aminoadipique qui devrait former le composé analogue. J'ai donc pensé qu'il pourrait y avoir intérêt à découvrir les propriétés de cet acide, facile à obtenir d'après le procédé ci-dessous, déjà décrit sommairement dans l'introduction de ce mémoire. Parmi ces propriétés, on se contentera de mentionner ici qu'il est considérablement moins soluble dans l'eau que les acides asparaginique et glutaminique racémiques, et si l'on peut s'attendre à ce qu'à l'instar des acides asparaginique et glutaminique, les modifications optiquement actives

sont moins solubles que le type racémique correspondant, il est probable qu'on n'aura guère de peine à décider si l'acide α -aminoadipique se trouve ou manque parmi les produits de la décomposition des protéines.

1. Éther butyronitrile-phtalimidomalonique.



Dans un ballon d' $1\frac{1}{2}$ litre, muni d'un tube réfrigérant à reflux surmonté d'un tube en U contenant du chlorure de calcium, on traita dans le bain d'huile, à env. 160° , $\frac{1}{5}$ mol. gr. d'éther phtalimido-sodomalonique (v. p. 10) par 40 gr. de γ -chlorobutyronitrile¹⁾ (calculé 21 gr.). Cette masse ayant été chauffée durant $\frac{1}{2}$ —1 heure, donna des signes de modification; mais elle était encore très pâteuse et, pour l'amener à une parfaite fluidité, il fallut la chauffer pendant aussi longtemps et l'agiter à diverses reprises, ce qui n'en laissa pas moins çà et là de petits grumeaux de la composition sodique isolés et échappant à la réaction. Un échantillon qu'on en leva brunissait fortement le papier curcuma humide. Pour atteindre la réaction neutre, il fallut chauffer ultérieurement pendant 3 ou 4 heures, entre 160 et 165° ²⁾. — L'excès de γ -chlorobutyronitrile fut ensuite enlevé par distillation à la vapeur d'eau, et l'huile jaune qui resta, fut transvasée avec de l'eau chaude dans une capsule, où elle ne tarda pas à se figer en cristaux. Complètement refroidie, la croûte cristalline fut pulvérisée, puis filtrée à l'aspirateur, et enfin lavée à l'eau froide pour enlever le chlore. Le rendement en produit sec répondit au calcul.

Pour la purification, le produit brut fut dissous en 200 cc. d'alcool chaud; par filtration on le débarrassa de quelques flocons non dissous, qui furent lavés avec 3×15 cc. d'alcool

¹⁾ S. Gabriel: Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXIII, 1771 (1890).

²⁾ L'emploi d'une température d'un peu plus de 180° a exercé une influence accélérante sur la réaction, de sorte qu'alors celle-ci s'est terminée plus vite; mais, en retour, le rendement fut moins bon, et la matière un peu colorée, même après une nouvelle cristallisation.

chaud. En refroidissant, en dernier lieu à l'eau glacée, la solution alcoolique ainsi obtenue, et en remuant fréquemment, on vit la nitrile se déposer sous forme d'un beau précipité blanc, à grains cristallins, dont le microscope révélait l'aspect très irrégulier: un mélange de types lamelleux, entremêlés de combinaisons en pyramides et prismes bien définis, bien qu'en général les formes fussent fragmentaires. La masse cristalline fut séparée de l'eau-mère par aspiration, puis lavée trois fois à l'aspirateur avec de l'alcool refroidi à la glace. Le premier produit donna un rendement de 54—56 gr.; mais en évaporant jusqu'à un petit volume l'eau-mère et l'alcool de lavage, on obtint encore 4 à 6 gr., en sorte que le rendement total fut environ 80 % de la quantité calculée¹⁾; pourtant, des expériences où je n'opérais qu'à mi-doses, m'ont donné un rendement un peu moindre, savoir 70—75 % de la quantité calculée.

Voici le résultat de l'analyse des préparations séchées à l'air:

0^{gr},1567 de la préparation A (premier produit) donnèrent au dosage de l'azote, une quantité d'ammoniaque répondant à 11^{cc},88 d'une dissolution d'hyposulfite de sodium norm. au $\frac{1}{14}$ (7,58 % d'azote).

0^{gr},2463 de la préparation B (premier produit) répondaient à 18^{cc},74 de la même solution d'hyposulfite (7,61 % d'azote).

0^{gr},3274 de la préparation C (second produit) répondaient à 24^{cc},96 de la même solution d'hyposulfite (7,62 % d'azote).

0^{gr},1950 de la préparation A donnèrent 0^{gr},0981 d'eau (5,59 % d'hydrogène) et 0^{gr},4397 d'acide carbonique (61,49 % de carbone).

		Calculé	Trouvé		
C ₁₉	228	61,29	61,49		
H ₂₀	20	5,38	5,59		
O ₆	96	25,80			
N ₂	28	7,53	7,58	7,61	7,62
	372	100,00			

¹⁾ Après cette opération, l'eau-mère contenait encore une certaine proportion de nitrile; c'est ce qu'on a observé en éliminant par distillation l'alcool et préparant de l'huile restante l'acide α -aminoadipique, par le procédé décrit dans la suite. C'est ainsi que de 46 gr. d'huile (petites quantités formant les restes de différentes préparations de nitrile) j'ai obtenu 6,8 gr. d'acide α -aminoadipique brut qui, après décoloration de sa solution faiblement acidulée par l'acide chlorhydrique au moyen du noir animal, m'ont donné 5 gr. d'acide cristallisé de nouveau et pur; 46 gr. de nitrile pure correspondent à env. 20 gr. d'acide α -aminoadipique.

Dans l'appareil de Roth la nitrile fond à 91°. Elle est très soluble dans le benzol, le chloroforme, l'acétone, l'éther acétique et l'alcool chaud, assez soluble dans l'éther et l'acide acétique glacial, peu soluble dans l'alcool froid, très peu soluble dans l'éther de pétrole et dans l'eau chaude, et insoluble dans l'eau froide.

La nitrile se laisse bien scinder par un traitement à l'acide chlorhydrique concentré; mais la réaction n'est que faible à des températures inférieures au point de fusion de la nitrile, et à des températures supérieures, il faut fréquemment secouer pour que l'acide chlorhydrique attaque volontiers la nitrile fondue. La scission a lieu bien plus facilement quand on dissout d'abord la nitrile dans une solution d'hydroxyde de sodium, donnant un sel sodique de l'acide tétrabasique:

COOH

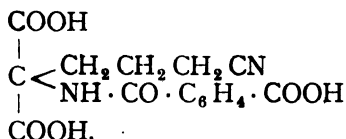
$\begin{array}{c} | \\ \text{C} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH} \\ | \\ \text{C} \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH} \end{array}$, que la chaleur dédouble ensuite en

COOH

présence de l'acide chlorhydrique (voir les réactions p. 4). Ces deux réactions sont presque spontanées, et il devient superflu de précipiter, encore moins est-il nécessaire de préparer pur le susdit acide tétrabasique: la solution du sel sodique peut être directement sursaturée d'acide chlorhydrique; car, comme la suite le fera ressortir, on réussit aisément à séparer l'acide α -aminoadipique du chlorure de sodium qui s'est formé en même temps.

2. Acide α -aminoadipique.

Dans une grande capsule de porcelaine on fit dissoudre $\frac{1}{20}$ mol. gr. (18^{gr},6) d'éther butyronitrile-phthalimidomalonique en le chauffant au bain-marie avec 100 cc. d'alcool. A la solution chaude on ajouta par portions une solution chaude de $\frac{2}{5}$ mol. gr. (16 gr.) d'hydroxyde de sodium dans 100 cc. d'eau. En ajoutant le premier quart de cette solution d'hydroxyde de sodium, l'on vit se former presque instantanément un précipité peu soluble dans l'alcool, mais bien soluble dans l'eau et constituant probablement le sel sodique de l'acide

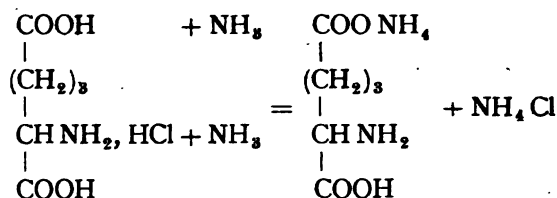


Lorsque, au bout de quelques minutes, on ajouta le reste de la solution d'hydroxyde sodique, tout fut dissous et donna un liquide limpide. Un chauffage ultérieur au bain-marie ne tarda pas à donner un vif dégagement d'ammoniaque. En prolongeant ce chauffage durant 2 heures et ajoutant plusieurs fois de l'eau pour maintenir constamment le volume à environ 200 cc., on fit presque disparaître l'odeur d'ammoniaque. Ensuite on versa cette solution dans un matras, avec addition de 150 cc. d'acide chlorhydrique concentré, et remit le tout au bain-marie, où il resta deux ou trois heures, pendant lesquelles on nota un vif dégagement d'acide carbonique. Puis on évapora la solution au bain-marie dans une capsule en porcelaine jusqu'à consistance de bouillie claire et, tout en refroidissant à la glace, on traita par 100 cc. d'acide chlorhydrique au titre d'env. 33 % (soit 4 volumes d'acide concentré et 1 volume d'eau). A ce degré de concentration, cet acide ne dissolvait que fort peu de chlorure de sodium et d'acide phtalique, mais il dissolvait très facilement le chlorhydrate de l'acide α -aminoadipique, et il fut possible d'effectuer à l'aspirateur la filtration de cette solution à travers deux couches de papier durci sans que celui-ci éclatât. Après avoir bien refroidi à la glace, on sépara par filtration le chlorure de sodium et l'acide phtalique, et le précipité subit sur filtre des lavages réitérés à l'acide chlorhydrique titrant environ 33 % et refroidi à la glace¹⁾.

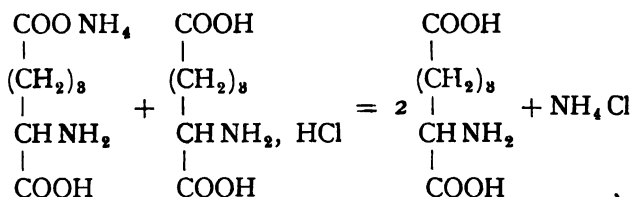
La solution évaporée au bain-marie forma au liquide jaune huileux, qu'on mit, dans un exsiccateur, sur de l'acide sulfurique concentré et de l'hydroxyde solide de potassium. Le lendemain l'huile était entièrement figée en une masse cristalline qui, pulvérisée dans la capsule, sentait encore fortement l'acide chlorhydrique; mais, abandonnée pendant 3 jours encore à l'influence de l'acide sulfurique et de l'hydroxyde de potassium et fréquemment remuée, elle perdit cette odeur. Alors on en fit à froid une dissolution aqueuse, dont on sépara par filtration une petite quantité d'acide phtalique non dissous. On fit deux parts égales de cette solution mesurant en tout 80 cc. et qui, en sus du

¹⁾ Le mélange de chlorure de sodium avec de l'acide phtalique a été traité par l'eau froide, et l'acide phtalique restant pesait, purgé de chlore et séché à l'air, 7 gr,4 (calculé 8 gr,3); il ne contenait que 0,05 milligramme d'azote par gramme, ce qui montrait que la décomposition de la nitrile avait été complète.

chlorhydrate de l'acide α -aminoadipique devait contenir un peu de chlorure de sodium, un peu d'acide phtalique et vraisemblablement un peu d'acide chlorhydrique. La première part consommée pour la neutralisation 11 cc. d'eau ammoniacale 5-norm. d'où résulta d'abord une précipitation de l'acide α -aminoadipique qui se dissolvait de nouveau par l'addition des derniers cent mètres cubes d'eau ammoniacale. La quantité d'ammoniaque calculée d'après l'équation



est de 10 cc. d'eau ammoniacale 5 norm., en sorte que cette moitié de la solution renferme encore une dose d'acides phtalique et chlorhydrique répondant à environ 1 cc. d'eau ammoniacale 5-norm. L'autre moitié fut donc additionnée de 1 cc. d'eau ammoniacale 5 norm. pour neutraliser ce qu'elle pouvait contenir d'acides chlorhydrique et phtalique libres; puis on mêla les deux moitiés. Le liquide, dont la température était d'environ 30°, fut remué et ne tarda pas à déposer l'acide α -aminoadipique en cristaux lamellés et incolores; car



Reposé jusqu'au lendemain, le liquide fut filtré à l'aspirateur, et le précipité purgé de chlore en lavant à l'eau froide. On en obtint de 6^{sr},3 à 6^{sr},8 d'acide sec.

En évaporant au bain-marie l'eau-mère et l'eau de lavage à petit volume, et en laissant reposer ensuite pour faire cristalliser, on put bien en obtenir encore une petite quantité; mais, comme on le fera remarquer dans la suite, on constata que cette méthode ne s'y prêtait pas. On vit qu'il valait mieux évaporer la solution additionnée d'un léger excès d'hydroxyde de sodium,

pour chasser l'ammoniaque, puis évaporer avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à consistance de bouillie claire, épuisant cette bouillie avec de l'acide chlorhydrique à 33 %, et terminant tout comme ci-dessus. Cette manipulation permet de recueillir de l'eau-mère et du liquide de lavage $\frac{1}{2}$ à 1 gr. d'acide α -aminoadipique, ce qui porta le rendement total à 90 % du rendement calculé.

L'acide obtenu était presque parfaitement pur; celui que donna l'eau-mère avait pourtant une certaine teinte jaunâtre; mais pour l'un et l'autre produit le point de fusion et la teneur en azote les rapprochaient beaucoup de l'acide pur.

En faisant recristalliser l'acide, il faut bien remarquer deux circonstances:

1° Après un chauffage prolongé ou même une évaporation de la solution aqueuse, celle-ci déposera peu ou point de nouveaux cristaux;

2° selon la température, l'acide peut cristalliser avec différentes quantités d'eau de cristallisation, à savoir à 0°, avec 1 molécule à peu près, tandis qu'au-dessus de 20° env. il est exempt d'eau et qu'aux températures intermédiaires on obtient un mélange des deux modifications.

Voilà pourquoi l'eau chaude ne se prête pas à la recristallisation de l'acide: même en limitant au strict nécessaire le chauffage au bain-marie, la solution renferme après le refroidissement plus que la petite quantité qui correspond à la solubilité dans l'eau froide (v. p 31). Ainsi, 3 gr. d'acide anhydre étant dissous en 100 cc. d'eau chaude et cette solution refroidie à la glace, on n'obtint que 2^{gr},26 d'acide hydraté, répondant à environ 2 gr. d'acide anhydre. Cet état de choses se manifesta nettement dans une expérience où 3 gr. d'acide α -aminoadipique brut, retiré de divers produits secondaires et par suite un peu coloré, furent dissous en un litre d'eau bouillante et chauffés au bain-marie avec du noir animal, après quoi on filtra la solution, l'évapora jusqu'à env. 100 cc. et la laissa cristalliser, ce qui ne donna que 0^{gr},5 (au vrai point de fusion et avec la vraie teneur en azote: 0^{gr},2100 répondaient à 18^{cc},13 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ [8,63 % d'azote, calculé à 8,70 %]). Additionnée d'alcool à volume égal et reposée jusqu'au lendemain, l'eau-mère fit encore tomber 0^{gr},22 (au vrai point de fusion et ayant la vraie teneur en azote: 0^{gr},2005 répondaient à 17^{cc},41 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ [8,68 % d'azote]). L'eau-mère qui resta fut évaporée au bain-

marie et laissa un liquide presque huileux, que le refroidissement figea en une masse à cristaux mal définis. En lavant cette dernière à plusieurs reprises à l'eau froide sur un filtre, on obtint la dissolution de presque tout, et il ne resta que 0^{gr},2 plus riches en azote qu'on ne l'avait calculé pour l'acide α -aminoadipique anhydre (0^{gr},1726 répondaient à 15^{cc},68 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ [soit 9,08 % d'azote, calculé à 8,70 %]). Enfin la dernière solution aqueuse obtenue, mélangée d'acide chlorhydrique, fut évaporée au bain-marie et, suivant le procédé décrit plus haut, on tira du chlorhydrate obtenu 1^{gr},3 d'acide α -aminoadipique pur et anhydre (0^{gr},2108 répondaient à 18^{cc},25 d'une solution d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ [8,66 % d'azote]). La cause de ce fait n'est pas indiquée par les expériences ci-dessus mentionnés; mais la vraisemblance et surtout la richesse en azote de la substance évaporée à siccité au bain-marie, parlent en faveur d'une formation d'anhydride dans la solution aqueuse chaude.

Le meilleur moyen de faire recristalliser l'acide α -aminoadipique est de le dissoudre dans l'eau ammoniacale ou dans l'acide chlorhydrique à un titre connu, après quoi l'on précipite de nouveau en ajoutant des doses proportionnées respectivement d'acide chlorhydrique ou d'eau ammoniacale. Dans ce cas, l'acide se précipite de nouveau et presque en entier; et l'on n'en perd que la partie dissoute par le lavage à l'eau froide, et si pour ce lavage on emploie de l'eau saturée à froid de cet acide, le rendement sera presque de 100 %, comme le feront ressortir les expériences ci-dessous.

L'acide hydraté se conservait à l'air, mais il perdait toute son eau, lentement dans le vide et sur l'acide sulfurique, rapidement dans le vide à 70—75°, pour la reprendre complètement à l'air humide à la température ordinaire. L'acide anhydre ne changeait pas de poids dans le vide à 70—75°, ni à l'humidité à la température ordinaire, et finalement, un acide cristallisé entre 10 et 15° se comportait comme un mélange d'acide anhydre et d'acide hydraté. En faisant recristalliser dans l'eau ou dans l'eau ammoniacale + l'acide chlorhydrique ou dans l'acide chlorhydrique + l'eau ammoniacale, on put transformer l'acide anhydre en hydraté, et réciproquement.

Expérience N° 1. 1 gr. d'acide anhydre étant dissous au bain-marie dans 40 cc. d'eau bouillante, la solution fut rapidement refroidie à l'eau frappée, ce qui fit tomber 0^{gr},80 d'acide hydraté, répondant à environ 0^{gr},72 d'acide anhydre.

0^{gr},4097 perdirent 0^{gr},0426 en 12 heures dans le vide à 70—75° (soit 10,40 %; 1 mol. d'eau répond à 10,06 %); en prolongeant la dessiccation, il n'y eut aucune perte; un séjour subséquent à l'humidité pendant 16 heures fit réabsorber 0^{gr},0427, et ensuite une exposition ultérieure ni à humidité, ni à l'air, ne changea rien au poids.

0^{gr},2009 donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 15^{cc},55 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (7,74 % d'azote, calculé pour 1 mol. d'eau: 7,82 %).

0^{gr},1895 donnèrent 0^{gr},1268 d'eau (7,44 % d'hydrogène) et 0^{gr},2799 d'acide carbonique (40,26 % de carbone).

Expérience N° 2. 1 gr. d'acide hydraté fut dissous, bien qu'un peu lentement, au bain-marie dans 30 cc. d'eau bouillante; lentement refroidie, cette solution donna 0^{gr},34 d'acide anhydre, répondant à env. 0^{gr},38 d'acide hydraté.

La quantité totale d'acide obtenu ne changea pas de poids, c'est-à-dire, ne donna pas des variations d' $\frac{1}{2}$ mgr. pour les différentes pesées, quand on l'exposa pendant 16 heures dans le vide à 70—75° ou à l'humidité durant 16 heures.

0^{gr},1347 répondaient à 11^{cc},60 d'une solution d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (8,61 % d'azote, calculé à 8,70 %).

Expérience N° 3. 1 gr. d'acide anhydre fut dissous au bain-marie dans 40 cc. d'eau bouillante, et la solution fut refroidie rapidement à l'eau froide (env. 10°); quand on l'agita avec une baguette de verre, l'acide ne tarda pas à se déposer, après quoi le tout fut laissé à la température ambiante jusqu'au lendemain, et alors on trouva que la totalité de l'acide déposé pesait 0^{gr},75.

0^{gr},4647 perdirent 0^{gr},0426 (9,17 %) dans le vide en 16 heures à la température de 70—75°, et reprirent 0^{gr},0423 à l'humidité.

0^{gr},2171 répondaient à 17^{cc},10 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (7,88 % d'azote, ce qui correspond à 8,68 % d'azote dans l'acide anhydre).

On a donc ici un mélange d'acide hydraté et d'acide anhydre.

Expérience N° 4. 1 gr. d'acide hydraté dissous dans 20 cc. d'eau et 1^{cc},5 d'acide chlorhydrique 5-norm. fut reprecipité quand on ajouta 1^{cc},5 d'eau ammoniacale 5-norm. (la température était de 24 à 25°). Après un jour de repos, on filtra, et débarrassa l'acide de son chlore en lavant avec de l'eau froide et saturée d'acide anhydre. On en tira 0^{gr},88 d'acide anhydre, répondant à env. 0^{gr},98 d'acide hydraté.

Séché à l'air, l'acide isolé ne changeait pas de poids dans le vide à 70—75°, ni à l'air.

0^{gr},2062 répondaient à 17^{cc},90 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (8,68 % d'azote).

Au titrage par de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.) et de la phénolphtaléine, 0^{gr},2810 exigèrent 17^{cc},74; calculé 17^{cc},52. (Le virage était difficile à observer.)

0^{gr},2309 donnèrent 0^{gr},1442 d'eau (6,95 % d'hydrogène) et 0^{gr},3792 d'acide carbonique (44,78 % de carbone); (calculé à 6,83 % d'hydrogène et 44,72 % de carbone).

Expérience N° 5. 1 gr. d'acide anhydre fut dissous en 20 cc. d'eau additionnée de 2 cc. d'eau ammoniacale 5 norm., et l'on refroidit la solution dans un mélange réfrigérant assez fort pour faire

apparaître dans le liquide quelques glaçons; puis on y ajouta, en remuant bien, 10 cc. d'acide chlorhydrique normal refroidi à la glace. Laisse dans une glacière jusqu'au lendemain, le liquide fut filtré, et le précipité lavé avec de l'eau froide et saturée d'acide hydraté. On en eut 1^{er},05 d'acide hydraté, répondant à env. 0^{er},94 d'acide anhydre.

0^{er},6014 perdirent dans le vide à 70—75° en 16 heures 0^{er},0618 d'eau (10,28 %), et les recouvrèrent entièrement à l'humidité.

0^{er},2014 répondaient à 15 cc,55 d'hyposulfite norm. au 1/14 (7,72 % d'azote).

Acide α -aminoadipique anhydre.

		Calculé	Trouvé					
C ₆	72	44,72	44,78	..				
H ₁₁	11	6,83	6,95					
O ₄	64	39,75						
N	14	8,70	8,68	8,63	8,68	8,66	8,61	
	161	100,00						

Acide α -aminoadipique avec 1 mol. d'eau.

		Calculé	Trouvé	
C ₆	72	40,22	40,26	
H ₁₃	13	7,26	7,44	
O ₆	80	44,70		
N	14	7,82	7,74	7,72
	179	100,00		
H ₂ O	18	10,06	10,40	10,28

L'acide anhydre cristallisa en lamelles; le microscope y révéla principalement des fragments foliiformes souvent formant des agglomérats de feuilles longues et minces, ou bien, mais assez rarement, des feuilles bien développées, à quatre ou six côtés.

L'acide hydraté se présentait sous forme de précipité à grains fins, où le microscope faisait voir des aiguilles assez épaisses, souvent soudées entre elles, parfois des cristaux prismatiques bien formés, à quatre ou six pans.

Chauffé rapidement dans un tube capillaire, l'acide anhydre fondait entre 204 et 206° (corr.), l'hydraté à quelques degrés de moins. La fusion était accompagnée d'une effervescence faible mais manifeste quand il s'agissait de l'acide anhydre, et d'une forte écume lorsque l'acide était hydraté.

L'un et l'autre acide étaient très peu solubles dans l'alcool, tant chaud que froid, et dans l'éther. L'eau froide dissolvait presque deux fois plus de l'acide hydraté que de l'anhydre; car 1 gr. d'acide hydraté était dissous à 19—20° par env. 240 gr. d'eau, tandis que pour se dissoudre à la même température, l'acide anhydre exigeait près de 450 gr. d'eau.

1/2 gr. d'acide hydraté fut traité pendant 2 heures par 50 cc. d'eau dans un agitateur et à la température ordinaire; puis on tira par filtration l'échantillon *a*, et de même; après encore 2 heures d'agitation, l'échantillon *b*.

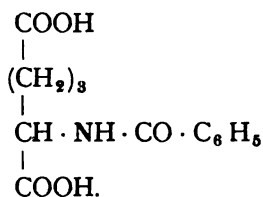
L'échantillon *a* pesait 16^{gr},162 (température 19°), et contenait 5^{mgr},22 d'azote, répondant à 66^{mgr},75 d'acide hydraté avec 1 molécule d'eau, c'est-à-dire que 1 gr. d'acide hydraté se dissolvait en 241^{gr},1 d'eau.

L'échantillon *b* pesait 22^{gr},705 (température 20°), et renfermait 7^{mgr},34 d'azote, répondant à 93^{mgr},86 d'acide hydraté, soit: 1 gr. d'acide hydraté exigeait 240^{gr},9 d'eau.

1/2 gr. d'acide anhydre fut traité par 50 cc. d'eau à la température ambiante et en agitant pendant 2 heures, après quoi on leva par filtration l'échantillon *c*.

L'échantillon *c* pesait 16^{gr},834 (température 19°) et contenait 3^{mgr},22 d'azote, répondant à 37^{mgr},01 d'acide anhydre, soit 1 gr. d'acide anhydre dissous en 453^{gr},8 d'eau.

3. Acide benzoyl- α -aminoadipique :



J'ai obtenu ce composé une fois seulement et par occasion.

A une solution alcoolique contenant 1/50 mol. gr. (7^{gr},4) d'éther butyronitril-phthalimidomalonique incomplètement hydrogéné par le sodium (voir la dernière section de ce mémoire, p. 60), on ajouta de l'eau, et en chassa l'alcool. On additionna de l'acide chlorhydrique concentré, ce qui transforma l'éther en un mélange de chlorhydrates d'acide α -aminoadipique et d'acide α - ϵ -diaminocaproïque, qu'une addition d'acide chlorhydrique au titre 33 % permit de séparer des chlorure de sodium et acide phthalique formés simultanément. Le mélange des chlorhydrates fut benzoylé de la manière ordinaire par le chlorure de benzoyle dans

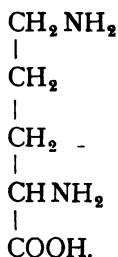
un liquide légèrement alcalin. D'une part on eut de la peine à tirer de ce mélange l'objet proprement dit de l'expérience, savoir l'acide α - ε -diaminocaproïque, à un degré de pureté suffisant pour l'analyse; mais d'autre part on réussit aisément à délivrer l'acide benzoyl- α -aminoadipique de l'acide α - ε -dibenzoyle-diaminocaproïque, desquels le premier est assez peu soluble dans l'eau et l'alcool à la température ordinaire, tandis que l'autre est assez soluble dans l'alcool¹⁾. Après recristallisation dans l'eau chaude, l'acide α -benzoyl-aminoadipique formait un beau précipité blanc et cristallin, où le microscope révéla surtout des prismes à quatre pans bien développés.

Le point de fusion était de 184° (corr.).

$0.87,1445$ donnèrent par le dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à $7^{\text{cc}},65$ d'hyposulfite norm. au $1/14$ ($5,29\%$ d'azote, calculé $5,28\%$).

$0.87,2026$, titrés par de la phénolphthaléine et de l'hydroxyde de baryum ($0,0996 \times \text{norm.}$), en exigèrent $15^{\text{cc}},28$; calculé: $15^{\text{cc}},35$.

IV. Acide α - δ -diaminovalérique:



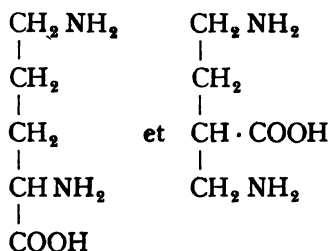
Il y a 25 ans, M. Jaffé²⁾ recueillit des excréments de poules nourries à l'acide benzoïque, et il en retira un acide: $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{N}_2$, qu'il dénomma acide ornithurique. Il prépara quelques sels de cet acide, entre autres l'ornithurate de calcium qui est caractéristique. En dédoublant l'acide ornithurique par l'acide chlorhydrique, il constata que le premier devait être considéré comme un acide diaminovalérique, dans lequel deux atomes d'hydrogène étaient remplacés par deux radicaux $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$. L'intérêt des travaux importants de Jaffé s'accrût encore quand E. Schulze et E. Winterstein³⁾, faisant bouillir avec une solution d'hydroxyde de ba-

¹⁾ Conférer Clara Wildenow: Zeitschrift f. physiol. Chem. XXV, 525 (1898).

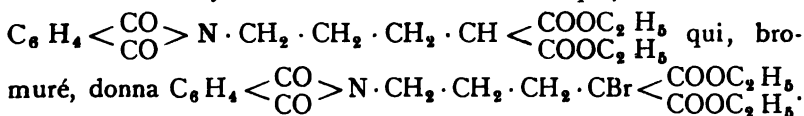
²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. X, 1925 (1877) et XI, 406 (1878).

³⁾ Ibid. XXX, 2879 (1897), et Zeitschrift f. physiol. Chem. XXVI, 1 (1898).

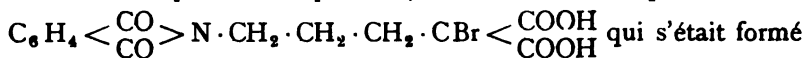
ryum réussirent à dédoubler l'arginine en urée et en un acide diaminovalérique qui, traité par le chlorure de benzoyle dans un liquide alcalin, donna l'acide ornithurique de Jaffé. Peu après, A. Ellinger¹⁾, se servant de bactéries de putréfaction, parvint à décomposer l'acide diaminovalérique de Jaffé en acide carbonique et en tétraméthylendiamine, définissant par là le rapport mutuel de position des deux radicaux NH_2 dans la molécule. Après cela il ne restait plus à choisir qu'entre ces deux formules-ci :



pour représenter le susdit acide diaminovalérique, et par la belle synthèse que E. Fischer²⁾ a faite récemment de l'acide α - δ -diaminovalérique racémique il est devenu très vraisemblable que la première de ces formules est la vraie. La substance que E. Fischer prit pour point de départ, fut l'éther γ -phtalimidopropyl-malonique tiré par S. Gabriel³⁾ des phtalimide potassique, bromure de triméthylène et éther d'acide malonique, savoir



Convenablement traitée par le bromure d'hydrogène, cette dernière combinaison put être saponifiée, et l'acide malonique substitué



à sa place, pouvait, à une température de 140 à 145°, dégager de l'acide carbonique avec formation d'acide δ -phtalimido- α -bromovalérianique: $\text{C}_6\text{H}_4 < \begin{smallmatrix} \text{CO} \\ \text{CO} \end{smallmatrix} > \text{N} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CHBr} \cdot \text{COOH}$.

Cette dernière substance, étant traitée par l'ammoniaque en tube scellé, et le produit de la réaction étant ensuite chauffé

¹⁾ Zeitschrift f. physiol. Chem. XXIX, 334 (1900).

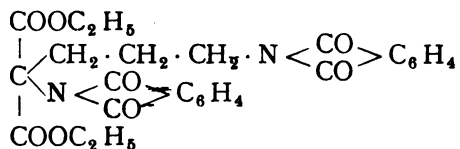
²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 454 (1901).

³⁾ Ibid. XXIII, 1767 (1890), et XXIV, 1365 (1891).

avec de l'acide chlorhydrique dans des tubes scellés, se scinda en acide phtalique et en un acide α - δ -diaminovalérique qu'on caractérisa en le transformant en son substitut dibenzoylé. L'acide ornithurique extrait des produits naturels était optiquement actif, et il va de soi que le produit artificiel en différait; mais, abstraction faite de cela, Fischer constata un si parfait accord entre les acides ornithuriques naturel et artificiel que, d'après lui, c'est à peine si l'on saurait douter que l'acide ornithurique naturel dérive de l'acide α - δ -diaminovalérique.

Le procédé décrit plus loin pour la préparation de l'acide ornithurique artificiel, ou acide α - δ -diaminovalérique racémique, est extraordinairement simple et donne un excellent résultat. La méthode est sommairement indiquée dans l'introduction de ce mémoire. Sur quelques points il me semble que l'acide ornithurique préparé par moi d'après ce procédé affecte de différer tant de celui que Fischer a produit par synthèse que de l'acide naturel, et la fin de ce mémoire présentera un tableau comparatif de ces divergences.

1. Éther phtalimido- γ -phtalimidopropyl-malonique :



Dans un ballon d' $1\frac{1}{2}$ litre, muni d'un tube rafraîchisseur à reflux et dont l'extrémité supérieure avait un tube en U contenant du chlorure de calcium, on fit réagir $\frac{1}{6}$ mol. gr. d'éther phtalimidosodomalonique (v. p. 10) sur 54 gr. ($\frac{1}{6}$ mol. gr. = 53^{gr},6) de γ -bromophtalimidopropyle¹⁾ pur et recristallisé dans l'éther de pétrole, en chauffant dans le bain d'huile vers 175°. Au bout d'une heure de chauffage, la réaction était déjà bien lancée; 2 heures encore, et la masse était tout à fait coulante, n'ayant que quelques grumeaux isolés, à réaction alcaline, et quand on eut chauffé pendant 4 heures en agitant à diverses reprises, la

¹⁾ Préparé par le procédé de S. Gabriel et J. Weiner (Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXI, 2671 [1888]).

réaction était terminée. On refroidit convenablement, et traita aussitôt par l'eau chaude au bain d'eau bouillante et en agitant bien, ce qui fit dissoudre le bromure de sodium; l'huile non dissoute se trouva alors assez coulante pour se laisser transvaser du ballon dans une capsule par des rinçages réitérés à l'eau chaude; mais il arriva aussi qu'on put constater le signe d'une excellente réaction, savoir que la masse commençait à se solidifier pendant qu'on la traitait par l'eau, et alors il fallait sacrifier le ballon. En tout cas cette matière se solidifia par le refroidissement, formant une masse dure, parfois assez plastique; on la lava ensuite à l'eau froide pour lui enlever son bromure de sodium. Le rendement en produit sec répondit au calcul; brute, la substance était d'un gris jaunâtre.

Pour la purifier, on la fit dissoudre dans 500 à 600 cc. d'alcool bouillant (environ deux fois la quantité nécessaire), et la solution chaude fut filtrée dans un entonnoir pour filtrer à chaud, où elle laissa un petit dépôt gélatineux de couleur jaunâtre. Au cours de la filtration, une partie du composé cristallisa ordinairement sur le filtre. C'est pourquoi on porta le filtre à l'ébullition avec 100 cc. d'alcool, qu'après filtration on ajouta à la dose principale. Refroidie rapidement et traitée enfin par l'eau de glace et simultanément bien remuée, cette solution fit tomber la combinaison sous forme d'un précipité très volumineux à cristaux fins, où le microscope révéla nombre de petites aiguilles, mais dont l'aspect était très irrégulier et fragmentaire¹⁾. Ce précipité fut séparé par filtration à l'aide d'un aspirateur, et subit un triple lavage soigneux avec l'alcool refroidi à la glace. Le rendement fut de 68 à 72 gr., mais l'eau-mère et l'alcool de lavage fournirent ultérieurement 5—6 gr., en sorte que le rendement total fut env. 75 % du produit calculé. Ici encore (comp. pp. 15 et 23) j'obtins relativement un peu moins en opérant sur des quantités moindres que celles qu'on vient d'indiquer.

Recristallisé, le produit avait un reflet jaunâtre ou grisâtre, qu'on ne pouvait pas faire disparaître par une nouvelle cristallisation dans l'alcool; on n'y découvrait pas trace d'impuretés.

¹⁾ Quand on faisait cristalliser lentement la substance dans une solution alcoolique, ou qu'on la faisait recristalliser dans l'éther (où la combinaison se dissolvait cependant assez difficilement), elle était susceptible de se déposer sous forme d'un beau précipité à gros cristaux qui, examinés au microscope, affectaient la forme de prismes quadrilatères et hectoédriques.

Séchés à l'air, ces préparations donnèrent à l'analyse le résultat suivant:

0^{gr},2722 de la préparation A donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 15^{cc},48 d'une solution d'hyposulfite norm. au 1/14 (5,69 % d'azote).

0^{gr},3167 de la préparation B répondaient à 18^{cc},16 de cette solution (5,73 % d'azote).

0^{gr},2835 de la préparation C répondaient à 16^{cc},23 de la même solution d'hyposulfite (5,72 % d'azote).

0^{gr},4082 de la préparation D répondaient à 23^{cc},24 de la même solution (5,69 % d'azote).

0^{gr},1856 de la préparation A donnèrent 0^{gr},0845 d'eau (5,06 % d'hydrogène) et 0^{gr},4316 d'acide carbonique (63,42 % de carbone).

		Calculé	Trouvé				
C ₂₈	312	63,41	63,42				
H ₂₄	24	4,88	5,06				
O ₈	128	26,02					
N ₂	28	5,69	5,69	5,73	5,72	5,69	
	492	100,00					

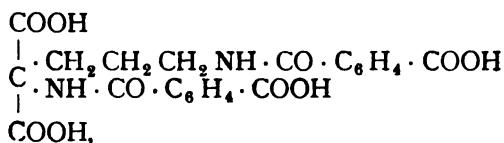
L'éther γ -phtalimidopropyl-malonique fondit vers 125° dans l'appareil de Roth, mais se contracta à quelques degrés avant le point de fusion.

La combinaison était très soluble dans le benzol, le chloroforme, l'acétone, l'éther acétique et l'alcool chaud, peu soluble dans l'alcool froid et dans l'éther; il était très peu soluble dans l'éther de pétrole et insoluble dans l'eau.

La combinaison en question contient souvent du triméthylènediphtalimide provenant, ou de ce que le γ -bromopropylphtalimide employé l'aurait contenu, ou de ce que le phtalimidomalonate d'éthyle aurait renfermé du phtalimide engendrant dans le phtalimidosodomalonnate d'éthyle du phtalimide sodique qui, avec le γ -bromopropylphtalimide produirait cette impureté. Celle-ci se révèle soit par la richesse de la substance en azote, soit par son hésitation à fondre complètement même à beaucoup au-dessus de 125°. Aucun procédé ne m'a réussi pour enlever cette impureté par recristallisation; si donc on veut un produit pur, il faut partir de matières pures. Du reste, ladite impureté n'a pas d'importance quand on veut préparer l'acide ornithurique par le procédé décrit plus loin (voir p. 44). Dans ce cas le triméthylènediphtalimide se transforme en un substitut dibenzoylique de

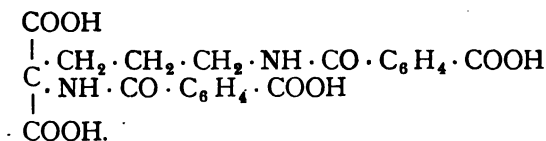
triméthylènediamine insoluble dans une faible lessive de soude et contrastant ainsi avec l'acide ornithurique.

L'éther phtalimido- γ -phtalimidopropylmalonique se laisse bien décomposer à chaud par l'acide chlorhydrique concentré ou par le bromure d'hydrogène concentré; mais même en employant ce dernier acide à des températures assez élevées, la réaction s'effectue très lentement. Sans dépasser les basses températures et avec beaucoup plus de facilité, on obtient cette décomposition par le procédé déjà mentionné (p. 5). Pour cela, on commence par dissoudre la combinaison dans une lessive de soude; il se forme alors un sel sodique de l'acide tétrabasique:



qu'on dédouble ensuite à chaud par l'acide chlorhydrique. Ces deux transformations s'effectuent avec une extrême facilité et sans que la température doive dépasser celle du bain-marie; il n'est pas besoin de précipiter, encore moins de produire à l'état de pureté le sus-mentionné acide tétrabasique; la solution du sel de soude, convenablement étendue, peut être sursaturée d'acide chlorhydrique, puis décomposée au bain-marie.

Toutefois, l'acide tétrabasique en question affecte deux formes, savoir celle d'une modification aqueuse bien soluble dans l'eau, surtout à chaud, et celle d'une modification anhydre se dissolvant très mal dans l'eau, même bouillante, et qu'on a beaucoup de peine à dédoubler par l'acide chlorhydrique bouillant. Pour empêcher l'apparition de cette dernière forme, on doit, en préparant l'acide ornithurique, suivre assez exactement la méthode décrite plus loin (voir p. 44), qui tient compte des propriétés différentes qu'ont ces deux modifications. Comme on l'a déjà dit, l'acide tétrabasique n'a pas besoin d'être pur pour servir à la préparation de l'acide ornithurique; mais il a été nécessaire de préparer ses deux modifications à l'état le plus pur possible, afin d'en étudier les propriétés respectives. Les expériences qui s'y rapportent se trouvent décrites avant qu'il soit parlé de la préparation de l'acide ornithurique.

2. Acide phtalamique- γ -propylphtalamique-malonique:

a. Modification hydratée (à environ 4 mol. d'eau). Dans un matras d'un litre contenant $\frac{1}{30}$ mol. gr. (24^{gr},6) d'éther phtalimido- γ -phtalimidopropylmalonique on versa une solution de $\frac{1}{2}$ mol. gr. (20 gr.) d'hydroxyde de sodium en 40 cc. d'eau. En agitant bien, on eut une bouillie épaisse, qu'on chauffa légèrement pendant quelques minutes; elle dégagait manifestement de l'alcool et se résolut complètement en un liquide jaunâtre oléagineux. Pendant une demi-heure on chauffa au bain-marie bouillant, ce qui donna un léger précipité blanc, sans doute un sel sodique de l'acide en question; refroidie et mise enfin dans la glace, la masse devint presque sirupeuse. On mit de la glace dans cette masse même, qui en devint plus coulante; on y fit tomber goutte à goutte, et en agitant bien, de l'acide chlorhydrique 5-norm. et refroidi à la glace, jusqu'à ce que le liquide montrât une petite réaction acide et que le précipité formé ne se redissolût plus. Puis on filtra, et en remuant bien, on versa petit à petit dans le liquide filtré et refroidi à la glace 100 cc. d'acide chlorhydrique 5-norm. et frappé, qui fit tomber l'acide tétrabasique partiellement en cristaux et en partie comme masse oléagineuse. Abandonnée dans l'eau de glace, souvent remuée et délivrée par trituration des plus forts grumeaux huileux, la totalité de l'acide ne tarda pas à se figer en une masse cristalline. A faible grossissement, on trouva des masses cristallines confuses, qu'un microscope plus fort résolvait en simples aiguilles toutes petites. On les pila bien dans un mortier et filtra, puis lava le précipité avec de l'eau frappée jusqu'à ce qu'on en eût enlevé le chlore.

Séché à l'air, l'acide hydraté rendit 18^{gr},6 (68,4 % du calculé: 27^{gr},2); mais, évaporés au bain-marie avec de l'acide chlorhydrique, puis traités comme on l'indiquera (p. 44) pour la préparation de l'acide ornithurique, les liquides filtré et de lavage donnèrent 4^{gr},1 de cet acide, soit 24,1 % de $\frac{1}{30}$ mol. gr. (17 gr.) d'acide ornithurique; les quantités totales trouvée et calculée avaient donc le rapport 92,5 à 100.

1^{er},2799 de l'acide séché à l'air perdirent par leur séjour dans le vide et sur l'acide sulfurique 11,06 % durant le premier jour; cette dessiccation prolongée, la perte journalière diminua de jour en jour; le cinquième jour la perte était inférieure à 1 milligramme, soit en tout 13,42 % (au lieu de 13,24 % pour 4 mol. d'eau); exposant ensuite à l'humidité, on constata qu'au bout de deux jours presque toute l'eau était rentrée (12,92 %).

0^{er},2992 donnèrent, au dosage de l'azote, une quantité d'ammoniaque répondant à 15^{cc},55 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (5,20 % d'azote, calculé pour 13,42 % d'eau dans l'acide: 5,13 % d'azote).

0^{er},3447, titrés par de la phénolphtaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), en exigèrent 25^{cc},20; calculé pour 13,42 % d'eau dans l'acide: 25^{cc},39).

L'acide hydraté peut aussi se tirer de l'anhydre, dont on mentionnera plus tard la préparation: pour cela, on dissout ce dernier dans une solution d'hydroxyde de sodium et précipite à froid la solution par l'acide chlorhydrique.

$\frac{1}{100}$ gr.-mol. (2^{er},36) d'acide anhydre fut dissous en 10 cc. d'une solution double normale d'hydroxyde de sodium (quantité calculée) + 30 cc. d'eau. Cette solution, refroidie à l'eau de glace, fut additionnée de 5 cc. d'acide chlorhydrique 5-norm., mais il n'en résulta aucun précipité même après $\frac{1}{2}$ heure passée dans le bain de glace, et bien qu'on remuât fréquemment. On ajouta alors 5 cc. d'acide chlorhydrique concentré, après quoi l'on agita le liquide, et il commença à s'y former un volumineux précipité blanc, que le microscope résolut en petites aiguilles entremêlées pourtant de quelques cristaux lamellés. Après trois heures d'exposition à la température de la glace fondante, on filtra, et le précipité fut purgé de chlore par lavage à l'eau frappée. Le rendement fut de 2^{er},3 (le calcul disait 2^{er},72).

0^{er},7916 d'acide séché à l'air subirent en trois jours, dans le vide sur l'acide sulfurique, une perte totale de 0^{er},1104 (13,95 %); durant la dernière journée le poids ne diminua que de 1 mgr. Exposé ensuite à l'humidité, il y eut récupération de 13,59 % d'eau.

0^{er},2042 donnèrent, au dosage de l'azote, une quantité d'ammoniaque répondant à 10^{cc},43 d'une solution d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (5,11 % d'azote).

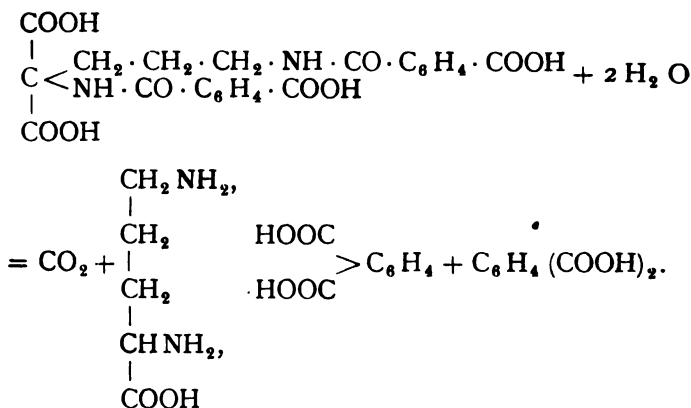
0^{er},2352 donnèrent 0^{er},1141 d'eau (5,39 % d'hydrogène) et 0^{er},4136 d'acide carbonique (47,96 % de carbone).

0^{er},3103, titrés par de la phénolphtaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), en exigèrent 22^{cc},70 (calculé pour un acide ayant 13,95 % d'eau: 22^{cc},72).

Calculé pour un acide tétrabasi- que, hydraté à 13,95 % d'eau		Trouvé
C	48,18	47,96
H	5,19	5,39
O	41,52	
N	5,11	5,11
100,00		

Chauffé rapidement dans des tubes capillaires, l'acide hydraté fondait avec effervescence quand on dépassait un peu 100° (101—106°); mais dès qu'on approchait de 90°, il commençait à se contracter. Déshydraté sur l'acide sulfurique, l'acide en question se contractait dès 115—120° et fondait en moussant avec force vers les 125°; exposé sur l'eau, l'acide déshydraté, en reprenant son eau de cristallisation, retrouvait le même point de fusion qu'avant d'avoir perdu son eau.

Dans l'eau froide l'acide hydraté était assez difficilement soluble; il se dissolvait aisément dans l'eau chaude et ne dégagait alors presque pas d'acide carbonique; mais en refroidissant il recristallisait mal. En prolongeant le chauffage de la solution au bain-marie, on scindait l'acide: il y eut non seulement un dégagement d'acide carbonique, mais en même temps une formation d'acide phtalique, dont une partie, la solution étant suffisamment concentrée, cristallisait par refroidissement, tandis qu'une autre partie, présente dans la solution comme phtalate d'«ornithine» (acide α - δ -diaminovalérique), ne se précipitait que par l'addition d'acide chlorhydrique:



Cependant, il n'y avait pas de décomposition complète de l'acide tétrabasique hydraté quand on le chauffait à l'eau seule; pour y arriver, il fallait chauffer en présence de l'acide chlorhydrique, et alors on eut naturellement la totalité de l'acide phtalique à l'état libre.

L'alcool dissolvait très aisément l'acide hydraté, même à la température ordinaire; l'éther donnait un précipité dans la solution. D'une part, l'eau ne donnait pas de précipité si les solutions alcooliques étaient faibles, et d'autre part, il suffisait d'ajouter à une forte solution alcoolique de l'acide 1 ou 2 volumes d'eau et de remuer le liquide pour y avoir bientôt un volumineux précipité, où le microscope révélait des groupes de belles aiguilles. Dans l'éther l'acide hydraté était très peu soluble.

b. Pour produire la modification anhydre de l'acide phtalamique- γ -propylphtalamique-malonique il ne suffisait pas de le déshydrater dans le vide sur l'acide sulfurique; car l'acide anhydre obtenu faisait contraste avec la modification anhydre telle qu'on va la décrire et pouvait soit reprendre l'eau de cristallisation par l'exposition à l'humidité, soit se dissoudre aisément dans l'eau chaude comme dans l'alcool froid, et enfin son point de fusion était env. 125° , c'est-à-dire de beaucoup inférieur à celui de la modification anhydre ($192-193^{\circ}$). La déshydratation de l'acide hydraté dans le vide à une température dépassant l'ambiante, enleva non seulement l'eau, mais encore l'acide carbonique.

Je n'ai pu trouver aucun procédé qui fasse obtenir un rendement passable de la modification anhydre; mais il est aisé de s'en procurer des quantités assez notables en sursaturant d'acide chlorhydrique concentré les solutions aqueuses du sel sodique sans les refroidir (comp. la préparation de la modification hydratée). En préparant l'acide ornithurique avant de connaître cet état de choses, il m'est parfois arrivé de dissoudre, comme on l'a décrit plus haut (v. p. 38), l'éther phtalimido- γ -propylphtalimido-malonique dans une forte lessive de soude, et comme je ne me proposais pas de préparer l'acide tétrabasique comme produit intermédiaire, la solution ne fut refroidie que jusqu'à la température ambiante, étendue d'un peu d'eau, puis sursaturée d'acide chlorhydrique concentré sans refroidissement ultérieur. Il en résulta une forte production de chaleur et un abondant dégagement d'acide carbonique, pendant lesquels se forma un

précipité huileux, que l'application de la chaleur au bain-marie fit en partie dissoudre et en partie cristalliser. Examiné de près, le précipité obtenu se trouva être non plus de l'acide phtalique pur, comme je l'avais d'abord admis, mais au contraire un mélange d'acide phtalique et de l'acide anhydre dont il est ici parlé. La teneur en azote était dans l'une des expériences 11 %, et dans l'autre 16 % de la totalité d'azote contenue dans la matière employée comme point de départ. Dans le premier cas le mélange d'acide phtalique et d'acide tétrabasique fut de nouveau dissous dans une lessive de soude, et le liquide résultant, suffisamment dilué et refroidi et additionné d'acide chlorhydrique, donna un précipité de l'acide *hydraté*, qui fut transformé en acide ornithurique, de la manière qu'on décrira plus tard. Dans l'autre cas, où l'expérience consumma $\frac{1}{10}$ mol. gr. (49^{gr},2) d'éther phtalimido- γ -propylphtalimido-malonique, on chercha d'abord à décomposer l'acide tétrabasique mêlé d'acide phtalique, en le chauffant pendant 3 heures au bain-marie avec 200 cc. d'eau et 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré; mais on n'y réussit guère, car l'acide phtalique obtenu par refroidissement, filtration et lavage à l'eau froide contenait encore un total de 313 mgr. d'azote, soit environ 11 % de la quantité d'azote de la matière servant de point de départ (2800 mgr. d'azote). L'acide obtenu en dernier lieu fut alors traité à plusieurs reprises par de l'eau bouillante, et des extraits aqueux qui en résultèrent on tira par refroidissement et cristallisation un acide phtalique presque absolument pur; il resta un résidu non dissous et constituant une poudre blanche presque insoluble dans l'eau chaude et qui, séchée à l'air, pesait 4 gr. (11 % de $\frac{1}{10}$ mol. d'acide tétrabasique anhydre pèsent 5^{gr},2).

0^{gr},2191 d'acide séché à l'air donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 12^{cc},98 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (5,92 % d'azote, calculé à 5,93 % pour l'acide tétrabasique anhydre).

0^{gr},2588 exigèrent pour la neutralisation à la phénolphtaléine comme indicateur 21^{cc},7 d'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), (calcul: 22^{cc},0).

Rapidement chauffé en tube capillaire, l'acide anhydre fondit entre 192 et 193° (corr.), mais vers 190° il commença à se contracter.

Dans l'eau froide l'acide anhydre était pour ainsi dire insoluble; il se dissolvait très difficilement dans l'eau chaude, et

dans l'éther il était très peu soluble, de même que la modification hydratée.

Dans l'alcool froid l'acide était difficilement soluble; au contraire, il se dissolvait assez aisément dans l'alcool chaud, et quand on ajoutait de l'eau à la solution alcoolique, on pouvait de nouveau en précipiter l'acide en presque totalité. $\frac{1}{2}$ gr. d'acide anhydre fut dissous en 15 cc. d'alcool chaud; dès qu'on refroidit, on vit se détacher de petits cristaux brillants, dont le nombre augmenta au fur et à mesure qu'on ajoutait de l'eau; on en mit peu à peu 60 cc. Le précipité, vu au microscope, présentait exclusivement de petits cristaux courts et prismatiques; on filtra et fit deux lavages à l'eau, après quoi le produit séché à l'air pesait 0^{gr},45. L'acide ainsi obtenu fondait dès 150° et, séché dans le vide sur l'acide sulfurique, perdait 2 % de son poids; on fit alors bouillir la totalité de l'acide dans 3×10 cc. d'eau, puis on filtra et lava de nouveau à l'eau froide; cette manipulation laissa 0^{gr},39 d'acide séché à l'air. La solubilité presque nulle dans l'eau chaude montrait donc clairement qu'il s'agissait ici de la modification anhydre de l'acide; mais même après qu'on eut traité par l'eau bouillante, le point de fusion dépassait encore à peine 150° et, déshydraté par l'acide sulfurique dans le vide, l'acide abandonna environ 2 % d'eau.

0^{gr},0821 d'acide séché dans le vide par l'acide sulfurique, donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 4^{cc},88 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (5,94 % d'azote, calcul: 5,93 %).

0^{gr},2519 du même acide que ci-dessus, titré par de la phénolphthaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), en exigèrent 21^{cc},3 (calcul: 21^{gr},4).

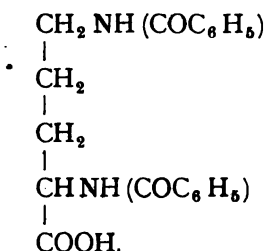
La modification anhydre se laisse transformer en l'hydratée, comme on l'a déjà mentionné (p. 39), et il résulte de ce qui précède qu'on peut préparer la modification anhydre en dissolvant l'acide hydraté dans une lessive de soude et précipitant ensuite, dans des conditions convenables, par l'acide chlorhydrique. J'ai également réussi à produire de très petites quantités de la modification anhydre simplement en traitant l'hydratée par l'acide chlorhydrique et chauffant un peu. A titre d'exemple, voici une expérience isolée:

2 gr. d'acide hydraté furent dissous en 30 cc. d'eau chaude, puis on y ajouta 30 cc. d'acide chlorhydrique concentré, et le tout fut chauffé à 50–60° en remuant fréquemment. Il ne tarda pas à se former un précipité cristallin, dont le microscope

révéla l'aspect très irrégulier, mais où il fit voir entre autres une quantité de cristaux aciculés, certainement composés de la modification hydratée de l'acide. On filtra le précipité, le lava à l'eau froide pour enlever l'acide chlorhydrique, puis on le fit *bouillir* à plusieurs eaux; il en resta à l'état non dissous environ 0^{gr},1 d'un acide très peu soluble dans l'eau chaude et qui, séché à l'air, fondait bien dès qu'il approchait de 180°, mais pourtant affectait la teneur en azote calculée pour l'acide anhydre.

0^{gr},0539 donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 3^{cc},18 d'hyposulfite norm. au ¹/₁₄ (5,90 % d'azote; calcul: 5,93 %).

**3. Acide α δ -dibenzoyle-diaminovalérique
(ou acide ornithurique artificiel):**



¹/₁₀ mol. gr. (49^{gr},2) d'éther phthalimido- γ -propylphthalimido-malonique traité dans un matras de 2 litres par une solution de 40 gr. d'hydroxyde de sodium en 80 cc. d'eau, se transforma en sel sodique d'acide phthalamique- γ -propylphthalamique-malonique (v. p. 38). On refroidit le liquide et l'étendit d'eau et de glace jusqu'à volume d'environ un litre, après quoi l'on y ajouta, peu à peu et en remuant bien, 250 cc. d'acide chlorhydrique 5-norm. (il fallait 200 cc. pour neutraliser la quantité employée d'hydroxyde de sodium); il n'en résulta aucun ou seulement un petit précipité, qui fut aisément dissous par la chaleur du bain-marie. En chauffant ainsi, l'on ne tarda pas à constater un abondant dégagement d'acide carbonique, qui cessa au bout d'une ou deux heures; alors on y ajouta encore 300 cc. d'acide chlorhydrique concentré, après quoi le liquide fut transvasé dans une capsule en porcelaine et évaporé au bain-marie jusqu'à abondant dépôt de sel marin et réduction de l'eau-mère à env. 100 cc. Après refroidissement, on ajouta 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré, et la masse fut bien écrasée au pilon dans la capsule. L'ayant laissée une heure dans l'eau frappée, on en sépara par filtration le mé-

lange obtenu de chlorure de sodium et d'acide phtalique, qu'on lava bien à plusieurs reprises avec un mélange, refroidi à la glace, de 4 volumes d'acide chlorhydrique concentré et d'un volume d'eau¹⁾. La solution chlorhydrique obtenue fut évaporée au bain-marie jusqu'à consistance sirupeuse, puis reprise à l'eau frappée à dose minima, et l'acide phtalique qui resta en fut séparé sur un petit filtre, puis subit un lavage réitéré à l'eau froide²⁾.

La solution aqueuse ainsi obtenue du chlorhydrate de l'acide α - β -diaminovalérique fut additionnée d'une lessive de soude 2-norm. jusqu'à réaction franchement alcaline, puis étendue d'eau au point de donner en tout près d' $\frac{1}{2}$ l. Refroidie à l'eau frappée, elle fut benzoylée par addition de dix doses égales de chlorure de benzoyle, en tout 47 cc. = 56 gr. (c'est-à-dire le double de la dose calculée), plus 425 cc. de lessive de soude 2-norm. (dose calculée: 400 cc.). A chaque addition, la fiole où l'on benzoylait, fut bouchée au liège et installée dans un seau rempli de glace et qu'on secoua dans un agitateur jusqu'à disparition de l'odeur de chlorure de benzoyle, ordinairement 15 à 20 minutes. Les additions de lessive de soude furent dosées de telle sorte que chacune d'elles, même la dernière, laissât un petit excès de cette lessive. Une fois benzoylée, la masse laissa sur le filtre un très faible précipité (probablement une trace de dibenzoyltriméthylènediamine due à ce que la matière d'origine contenait une trace de triméthylènediphtalimide). Le liquide filtré fut refroidi à la glace, et l'on y ajouta peu à peu 250 cc. d'acide chlorhydrique 2-norm., qui fit tomber un mélange d'acide benzoïque et d'acide ornithurique, lequel d'ordinaire cristallisait aussitôt. Resté tel jusqu'au lendemain, mais fréquemment remué, le liquide fut filtré à l'aspirateur, et le précipité débarrassé de chlore à l'eau froide. Puis on épuisa à l'eau bouillante le mélange des acides benzoïque et ornithurique jusqu'à n'avoir plus de cristallisation d'acide benzoïque dans les extraits aqueux refroidis. Enfin l'acide ornithurique restant fut bien malaxé à l'eau dans un mortier, puis soigneusement lavé à l'eau chaude dans un entonnoir *ad hoc*. Ce lavage ne fit perdre que très peu d'acide ornithurique; l'acide

¹⁾ Le mélange de chlorure de sodium et d'acide phtalique fut épuisé par l'eau froide, et l'acide phtalique qui resta, purgé de chlore et séché à l'air, pesait 27—30 gr. (calcul: 33gr,2) et ne contenait par gramme que 0mgr,2 d'azote.

²⁾ L'acide phtalique qui restait et qui était presque complètement exempt d'azote, pesait, après avoir été séché à l'air, 3 à 4 gr.

ornithurique brut séché à l'air rendit 28—30 gr., soit env. 85 % de la quantité calculée.

Cet acide ornithurique brut était presque parfaitement pur; il était d'un blanc pur; pour tous les échantillons que j'ai préparés, son point de fusion, au chauffage rapide en tube capillaire, était de 187—188° (corr.). (Pour l'acide ornithurique naturel Jaffé¹⁾ place le point de fusion à 182° [déc.]; Schulze et Winterstein²⁾ à 184°, et pour l'acide ornithurique artificiel, Fischer³⁾ indique 184—185° [corr. 187—188°]. Aussi, la composition répondait-elle à la formule. Sur un seul point l'on constata une différence entre les préparations brutes d'acide ornithurique et les produits recristallisés dans l'alcool, le séchage dans le vide à 120° laissant à ces derniers leur couleur parfaitement blanche, tandis que cette dessiccation donnait aux préparations brutes une teinte jaunâtre tellement faible qu'on ne pouvait en juger qu'en la confrontant avec la blancheur des préparations pures. Séché à l'air, l'acide ornithurique brut subissait par dessiccation dans le vide à env. 120° une perte de poids d'environ 0,1 % seulement. Voici le résultat des analyses des préparations ainsi séchées:

0^{gr},2143 de la préparation A donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 17^{cc},54 d'hyposulfite norm. au 1/14 (8,18 % d'azote).

0^{gr},2031 de la préparation B répondaient à 16^{cc},65 de cette solution (8,20 % d'azote).

0^{gr},3161 de la préparation C répondaient à 25^{cc},92 de cette solution (8,20 % d'azote).

0^{gr},2885 de la préparation D répondaient à 23^{cc},62 de cette solution (8,19 % d'azote).

0^{gr},2085 de la préparation E répondaient à 16^{cc},97 de cette solution (8,14 % d'azote).

0^{gr},2490 de la préparation B donnèrent 0^{gr},1339 d'eau (5,98 % d'hydrogène) et 0^{gr},6097 d'acide carbonique (66,79 % de carbone).

	Calculé		Trouvé							
			Acide ornithur. brut				Acide ornithur. recrist. (v. plus bas)			
C ₁₉	228	67,06	66,79				67,04			
H ₂₀	20	5,88	5,98				6,09			
O ₄	64	18,82								
N ₂	28	8,24	8,18	8,20	8,20	8,19	8,14	8,20	8,17	
	340	100,00								

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. X, 1927 (1877).

²⁾ Zeitschrift f. physiol. Chemie XXVI, 4 (1898).

³⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 463 (1901).

On purifia parfaitement l'acide ornithurique en le faisant recristalliser dans l'alcool, opération qui a un point assez intéressant pour amener à décrire en détail quelques expériences.

20 gr. de l'acide ornithurique B furent dissous en 300 cc. d'alcool bouillant. Placée dans l'eau froide et fréquemment remuée, la solution déposa en un jour un volumineux précipité, de belle apparence, blanc et cristallin, où le microscope faisait voir des faisceaux de cristaux aciculés. On filtra, et le précipité fut lavé trois fois à l'aspirateur avec de l'alcool absolu. L'acide ornithurique B_I, séché à l'air¹⁾, donna 13^{gr},5 qui, séchés dans le vide à 120°, gardèrent leur couleur blanche et perdirent env. 1 % en poids, le point de fusion restant entre 187 et 188° (corr.) comme avant la recristallisation. Voici le résultat de l'analyse de la préparation séchée dans le vide :

0^{gr},1904 donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 15^{cc},62 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (8,20 % d'azote).

0^{gr},2233 donnèrent 0^{gr},1224 d'eau (6,09 % d'hydrogène) et 0^{gr},5489 d'acide carbonique (67,04 % de carbone).

0^{gr},5488 titrés par de la phénolphthaléine et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 \times norm.), en exigèrent 16^{cc},20 (calcul: 16^{cc},21).

L'eau-mère et l'alcool de lavage de B_I furent évaporés jusqu'à volume d'env. 100 cc., puis laissés dans l'eau froide pendant la nuit. L'acide ornithurique B_{II} recristallisé fut traité comme B_I et, séché à l'air, donna un poids de 4^{gr},7. Elle aussi, cette portion resta blanche quand on la sécha dans le vide à 120°, mais y perdit 1,3 % de son poids. L'acide sec fondait à 187° (corr.) et contenait 8,17 % d'azote.

0^{gr},2021 répondaient à 16,52 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (8,17 % d'azote).

L'acide ornithurique contenu dans les eau-mère et alcool de lavage de B_{II} fut isolé en distillant l'alcool à la vapeur d'eau. Complètement refroidi, le liquide fut filtré et l'acide ornithurique lavé trois fois à l'eau bouillante, après écrasement dans un mortier. Séché à l'air, B_{III} pesait 1^{gr},4 et prit nettement une teinte jaunâtre quand on le sécha dans le vide à 120°, perdant alors env. 0,8 % de son poids. L'acide sec fondait entre 184 et 185° (corr.) et contenait 8,15 % d'azote.

¹⁾ D'une part, l'acide ornithurique brut séché à l'air ne perdait presque rien de son poids quand on le séchait dans le vide à 120°, et, de leur côté, les produits recristallisés dans l'alcool, puis séchés à l'air, perdaient $\frac{1}{2}$ —1 $\frac{1}{2}$ % de leur poids lorsqu'on les séchait ensuite dans le vide à 120°.

L'expérience qu'on vient de décrire montre clairement que la recristallisation dans l'alcool rend possible d'amasser dans la dernière eau-mère alcoolique les faibles quantités d'impuretés du produit brut. Cependant cela n'exclut pas le cas où, traitant l'acide ornithurique par l'alcool chaud, on peut produire une petite quantité d'ornithurate d'éthyle, qui s'amassera probablement dans la dernière eau-mère alcoolique. Sans justifier cette opinion, la petite expérience que voici la rend admissible.

6^{gr},8 d'acide ornithurique brut C furent portés à l'ébullition avec 125 cc. d'alcool absolu dans un matras muni d'un tube réfrigérateur ascendant (on avait soigneusement fait bouillir dans l'alcool les bouchons employés). Au bout d'un jour, on eut C_I (3^{gr},75) par simple cristallisation, et C_{II} (2^{gr},78) de l'eau-mère en éliminant l'alcool par la vapeur d'eau.

Dans le vide à 120° C_I perdit env. 0,5 % de son poids sans rien perdre de sa blancheur; point de fusion de l'acide sec: 187—188° (corr.); teneur en azote: 8,15 %.

C_{II} en pareil cas perdit env. 1,7 % en poids et se teignit légèrement en jaunâtre; l'acide sec fondait à 183—184° (corr.) et contenait 8,11 % d'azote.

En agitant avec de l'éther C_I, C_{II} et l'acide ornithurique brut, et enlevant ensuite par évaporation les extraits éthériques, on n'eut plus qu'un reste insignifiant des extraits fournis par l'acide ornithurique brut et par le produit C_I; ce reste cristallisa aisément, tandis que l'extrait éthérique de C_{II} abandonna une quantité d'huile peu considérable, il est vrai, mais qui pourtant se laissait bien peser; je ne réussis pas à le faire cristalliser. L'éther ne pouvant pas extraire cette huile du produit brut, il est naturel d'admettre qu'elle s'est formée pendant la recristallisation. Traités par l'éther, C_I et C_{II} furent de nouveau séchés dans le vide à 120°, après quoi C_I fondit entre 187 et 188° (corr.), et sa teneur en azote fut de 8,17 %, tandis que pour C_{II} le point de fusion fut entre 186 et 187°, la teneur en azote étant la même (8,17 %).

Le résultat collectif de ces expériences et de leurs analogues relativement à la recristallisation fut comme suit:

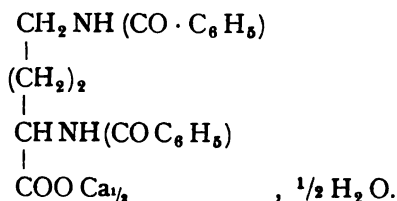
1° L'acide ornithurique brut, préparé comme on l'a décrit plus haut, doit être regardé comme à très peu près pur;

et 2° La recristallisation de l'acide ornithurique dans l'alcool peut fournir la majeure partie de l'acide à l'état de pureté par-

faite, et d'autre part le reste peut être retiré de l'eau-mère, mais alors il est mêlé d'une petite quantité d'une impureté huileuse.

Comme caractéristique parmi les produits dérivés de l'acide ornithurique naturel et de l'ornithine on peut mettre en relief spécial le sel calcaire d'acide ornithurique que Jaffé¹⁾ prépara le premier; de plus, la monobenzoylornithine préparée par lui²⁾ et la combinaison de l'isocyanate de phényle et de l'ornithine étudiée tout récemment par R. O. Herzog³⁾. Par comparaison, j'ai préparé les composés correspondants en partant de l'acide ornithurique artificiel.

4. Ornithurate de chaux:



Voici comment, en suivant les indications de Jaffé⁴⁾, je préparai ce sel de chaux qui caractérise l'acide ornithurique:

$1/300$ mol. gr. ($187,7$) d'acide ornithurique fut dissous en 20 cc. d'eau et quelques gouttes d'eau ammoniacale, et l'excès d'ammoniaque fut chassé au bain-marie bouillant; puis, ayant refroidi, on ajouta 4 cc. de chlorure de calcium 2-norm. (calculé à $2^{\circ},5$). Conformément aux indications de Jaffé, il n'en résulta aucun précipité tant que le liquide resta froid; mais le bain-marie bouillant ne tarda pas à donner lieu au dépôt d'un sel blanc à gros cristaux, que le microscope présenta comme composé de faisceaux et paquets de cristaux incolores purement lamellés (les autres auteurs qui ont décrit ce sel disent seulement qu'il est cristallin, mais ils ne parlent pas de l'aspect). Pendant $3/4$ d'heure on chauffa et remua le liquide, puis on le refroidit et le filtra, et le précipité fut débarrassé de son chlore par un lavage à l'eau froide. Le rendement fut de $187,3$ (calcul: $187,8$). Chauffant

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XI, 406 (1878).

²⁾ Ibid. XI, 408 (1878).

³⁾ Zeitschrift f. physiol. Chemie XXXIV, 525 (1902).

⁴⁾ A l'endroit cité.

ensuite l'eau-mère au bain-marie pendant deux heures, on n'eut qu'un dépôt de 0^{gr},05 d'un sel ayant tout à fait l'aspect du produit principal. L'analyse des produits séchés à l'air donna le résultat suivant:

0^{gr},4201 du sel A donnèrent 0^{gr},0325 de chaux calciné (5,52 % de calcium).

0^{gr},2732 du sel B donnèrent 0^{gr},0209 de chaux calciné (5,45 % de calcium).

0^{gr},2021 du sel A donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 15^{cc},30 d'hyposulfite norm. au ¹/₁₄ (7,57 % d'azote).

0^{gr},1937 du sel B répondaient 14^{cc},70 de cette solution (7,56 % d'azote).

0^{gr},2065 du sel B donnèrent 0^{gr},1039 d'eau (5,59 % d'hydrogène) et 0^{gr},4681 d'acide carbonique (61,84 % de carbone).

0^{gr},5858 du sel A, restés dans le vide sur l'acide sulfurique pendant 24 heures, avaient perdu 1 mgr.; mais ensuite, ni dans le vide sur l'acide sulfurique, ni dans le vide à 70°—75°, ils ne perdirent rien en 24 heures, tandis que dans le vide entre 110° et 115° ils perdirent encore 13^{mgr},8 peu à peu et en 4 jours, au bout desquels le poids ne changea plus. (La perte totale fut de 2,53 %.) 2 heures de séjour sur l'eau à la température ordinaire suffirent pour faire reprendre toute l'eau.

0^{gr},9823 du sel C se comportèrent exactement comme le sel A, perdirent une quantité insignifiante dans le vide sur l'acide sulfurique, puis rien dans le vide à 70°—75°. Après un séjour de 2 fois 48 heures dans le vide entre 110° et 115°, la perte de poids fut constante, savoir 0^{gr},0253 = 2,58 %; exposé ensuite à l'air à la température ordinaire, ledit sel récupéra en 6 heures toute son eau, en se mettant en grumeaux. Un séjour prolongé à l'air ou sur l'eau ne fit pas augmenter le poids de plus de 1—2 mgr., et en prolongeant pendant plusieurs semaines la dessiccation dans le vide sur l'acide sulfurique, la plus forte diminution du poids ne dépassa pas 1—2 mgr., ce qui était évidemment dû à l'adhérence de l'humidité.

Trouvé			Calculé		
			A	B	C
C ₃₈	456	61,96		61,84	
H ₄₀	40	5,43		5,59	
O ₉	144	19,57			
N ₄	56	7,61	7,57	7,56	
Ca	40	5,43	5,52	5,45	
736			100,00		
H ₂ O	18	2,45	2,53		2,58

Les analyses précédentes mettent en évidence que l'acide ornithurique artificiel préparé par moi donne un sel de calcium

qui, séché à l'air, contient par atome de calcium une molécule d'eau impossible à éliminer par le vide et l'acide sulfurique et ne disparaissant qu'avec lenteur dans le vide entre 110° et 115° . Le sel déshydraté était tellement avide d'eau que j'ai constaté le fait suivant: Exposé dans un séchoir à évacuer contenant de l'air ordinaire à la température ambiante, un sel déshydraté n'avait pas tardé à s'humecter à tel point que même après avoir chauffé dans le vide entre 110° et 115° pendant 24 heures, on n'avait pas encore rééliminé toute l'eau. Dans les essais de dessiccation décrits plus haut les pesées ne furent, en conséquence, répétées qu'à 48 heures d'intervalle.

E. Fischer¹⁾, contrairement à ce qui précède, indique que le séchage dans le vide sur l'acide sulfurique enlève toute l'eau du sel calcique ornithurique racémique préparé par lui. Il n'en donne qu'une analyse, dosage du calcium, qui ne suffit pas à décider la question (il trouva 5,53 % de calcium; calculé: 5,57 % pour le sel anhydre, et 5,43 % pour l'hydraté). Quant à l'acide ornithurique optiquement actif tiré des produits naturels, Schulze et Winterstein²⁾ ont examiné le sel calcique d'un acide ornithurique obtenu par la décomposition de l'arginine; cependant ils se sont contentés d'un dosage de calcium (5,48 % de Ca), tandis que Jaffé³⁾ donne des analyses complètes de sels calciques d'un acide ornithurique tiré des excréments de poules nourries à l'acide benzoïque. Dans son mémoire M. Jaffé n'indique pas comment le sel a été séché avant l'analyse, mais, sur ma demande, ce savant a eu la bonté de m'apprendre que la dessiccation a vraisemblablement dû avoir lieu entre 105° et 110° . Les analyses de Jaffé et, en ce cas, surtout les dosages du carbone, font ressortir qu'il a analysé un sel anhydre (trouvé dans une préparation: 63,68 % de carbone, et dans une autre: 64,2 % de carbone; calculé pour le sel anhydre: 63,5 % de carbone, et pour l'hydraté: 61,96 % de carbone). La petite expérience ci-dessous, faite après réception de la communication de M. Jaffé, montre que le sel calcique sus-décrit de l'acide ornithurique artificiel contient encore 1 mol. d'eau après une dessiccation entre 105° et 110° , et contraste ainsi avec le sel calcique de Jaffé.

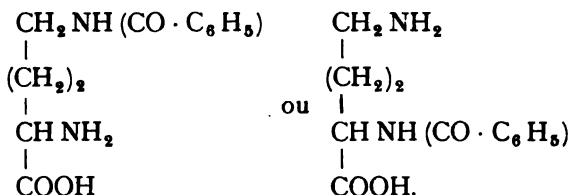
¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 463 (1901).

²⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie XXVI, 5 (1898).

³⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XI, 406 (1878).

0^{gr},8126 du sel C séchés entre 108° et 110° dans un séchoir ordinaire, perdirent en 2 jours 0^{gr},0012 (d'humidité adhérente), puis, rien en 3 jours entre 108° et 110°, ni rien non plus en deux jours entre 119° et 122° durant la dessiccation dans le même séchoir; au contraire, lorsqu'ensuite on dessécha dans le vide entre 115° et 117°, la perte fut de 0^{gr},0200 en 2 jours (2,46 %, calculé pour 1 mol. d'eau: 2,45 %), et en prolongeant le séjour dans le vide entre 115° et 117°, on ne fit pas changer le poids en 2 jours; finalement, exposé à l'air, le sel desséché y reprit 0^{gr},0216 d'eau.

5. Acide monobenzoyle- α - δ -diaminovalérique
(Monobenzoyle-ornithine):



$\frac{1}{100}$ mol. gr. (3^{gr},4) d'acide ornithurique fut traité d'après le procédé Jaffé¹⁾ et mis avec 100 cc. d'acide chlorhydrique à 20 % dans un ballon d' $\frac{1}{2}$ litre placé dans un bain d'huile à 140°. On chauffa pendant 2 heures, et presque tout étant dissous (le liquide était réduit alors à environ la moitié de son volume), on refroidit à l'eau frappée et filtra pour éliminer l'acide benzoïque déposé. Le liquide filtré fut évaporé au bain-marie, en ajoutant souvent de l'eau, jusqu'à production d'une masse huileuse, qu'on traita par l'eau froide à petite dose, après l'avoir refroidie à la glace. Ayant séparé par filtration l'acide benzoïque non dissous, le liquide restant fut neutralisé à l'eau ammoniacale, ce qui fit tomber la monobenzoylornithine en cristaux lamellés d'une blancheur éclatante, qu'on laissa séjourner un peu dans l'eau frappée, puis sépara par filtration et lava à l'eau frappée. Le rendement fut de 0^{gr},75, et l'eau-mère donna encore 0^{gr},16; mais le calcul ayant indiqué 2^{gr},36, on voit qu'une partie de l'acide ornithurique avait cédé les deux groupes de benzoyle. La monobenzoylornithine fut recristallisée en 30 cc. d'eau chaude, et un refroidissement lent la sépara de la solution sous forme de précipité lamellé, blanc et luisant, qui pesait 0^{gr},38 après le sé-

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XI, 408 (1878).

chage à l'air et deux lavages à l'eau froide (produit I). L'eau-mère et l'eau de lavage donnèrent par évaporation 0^{gr},25 (II).

Tant I que II présentèrent au microscope des lames bien développées, souvent en parallélogrammes, ayant parfois 2 coins abattus, ce qui les rendait hexagonaux. Quelquefois les lames étaient triangulaires; mais le plus souvent les angles étaient coupés, de sorte que ces lames avaient six côtés, elles aussi. L'aspect était donc identique à ce que E. Fischer¹⁾ indique pour la monobenzoylornithine racémique préparée par lui, tandis que suivant Jaffé²⁾ ainsi que d'après Schulze et Winterstein³⁾ la monobenzoylornithine naturelle cristallise en aiguilles fines.

0^{gr},1085 de la préparation I donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 12^{cc},87 d'hyposulfite norm. au 1/14 (11,86 % d'azote, calculé 11,86 %).

0^{gr},1645 de la préparation II répondaient à 19^{cc},47 de la même solution (11,84 % d'azote).

Le point de fusion de la monobenzoylornithine naturelle est placé par Jaffé à env. 225°—230°, et par Schulze et Winterstein entre 225° et 240°, et Fischer place tout à fait pareillement celui de la combinaison racémique, «welche bei 225° erweichte, gegen 238° unter Gasentwicklung völlig schmolz». Mais cela ne cadre pas avec ce que j'ai trouvé; car, rapidement chauffés en tubes capillaires (ce qui dans le cas présent signifie, chauffés rapidement jusqu'à env. 200°, puis à raison de 10° de plus par minute), toutes mes préparations recristallisées changeaient bien d'aspect et commençaient à se contracter entre 230° et 240° (corr.), pour fondre peu à peu si l'on continuait à chauffer; mais la fusion totale avec dégagement d'air n'avait lieu qu'entre 255° et 260° (corr.). S'il était difficile de déterminer exactement le point de fusion, celui de la décomposition était très facile à préciser, et sans doute la fusion complète ne s'accomplissait qu'au moment où cette décomposition avait lieu. Que les points de fusion et de décomposition de mes préparations dussent être supérieurs à 238°, c'est ce qu'ont montré également des expériences réitérées, où le tube capillaire était chauffé de la manière décrite plus haut à 240° (corr.), puis maintenu 5 minutes entre 240° et 245° sans fusion complète, la

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXIV, 463 (1901).

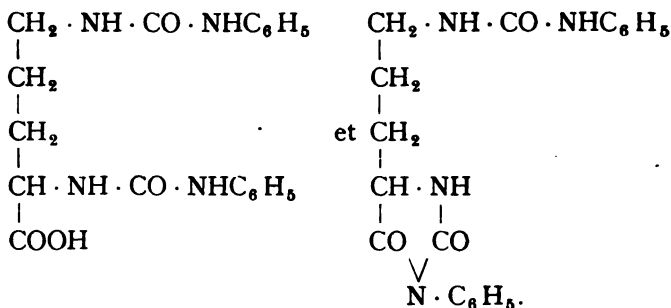
²⁾ A l'endroit cité.

³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie XXVI, 5 (1898).

substance ne faisant que se contracter; mais si l'on chauffait plus fort, elle fondait entièrement dès 248° ou 250° (corr.) en dégageant de l'air.

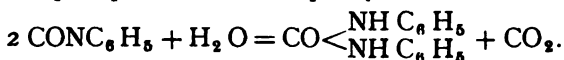
La solubilité de la substance répondait tout à fait à ce que donne Jaffé pour la monobenzoylornithine naturelle: elle se dissolvait sans difficulté dans les acides ou dans l'ammoniaque et assez facilement dans l'eau chaude (avec réaction neutre), mais difficilement dans l'eau froide et très difficilement dans l'alcool même chaud, enfin nullement dans l'éther.

6. Combinaison d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne de l'acide α - δ -diaminovalérique:



a. Combinaison d'isocyanate de phényle. $\frac{1}{50}$ mol. gr. (6^{gr},8) d'acide ornithurique fut traité par 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré dans un ballon d'1 $\frac{1}{2}$ litre tenu pendant 2 heures dans le bain d'huile en portant la température de 100° à 140° ; puis on ajouta encore 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré et continua à chauffer à 140° durant 2 heures. Refroidi à l'eau frappée, le liquide laissa sur le filtre l'acide benzoïque, qu'on lava deux fois à l'eau froide; puis les liquide filtré et de lavage étant réduits par évaporation à un volume très petit, on chauffa encore dans le bain d'huile pendant 2 heures et à 140° avec 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré. L'acide chlorhydrique fut ensuite évaporé au bain-marie et laissa un résidu huileux, jaune de chlorhydrate d'ornithine, qui fut dissous en 50 cc. d'eau. La solution fut mêlée d'éther et agitée à plusieurs reprises pour en éliminer les dernières traces d'acide benzoïque; puis on chauffa au bain-marie jusqu'à disparition de l'odeur d'éther. La solution ainsi obtenue étant neutralisée par l'hydroxyde de sodium, on la mit dans une fiole de 250 cc., la refroidit bien,

puis la traita par 25 cc. de lessive de soude 2-norm. et 6^{gr},3 d'isocyanate de phényle (calculé: 20 cc. de lessive de soude et 4^{gr},8 d'isocyanate); volume total: 110 cc. Simultanément agité à la machine et refroidi à l'eau frappée, au bout d'une heure le liquide ne sentait plus l'isocyanate de phényle et avait déposé un assez fort précipité blanc de diphénylurée:



Le liquide avait encore une réaction légèrement alcaline; on y ajouta 10 cc. de lessive de soude 2-norm. et 3 gr. d'isocyanate de phényle; puis on répéta pendant une heure l'agitation et le refroidissement à la glace. Il en résulta une masse assez peu coulante, qu'on délaya dans 100 cc. d'une solution à 5 % de chlorure de sodium, après quoi on reprit l'agitation et filtra. Cette filtration fut très lente, et la diphénylurée restée sur le filtre¹⁾ dut être lavée avec une solution à 5 % de chlorure de sodium, l'eau ne donnant qu'un filtratum terne. Le mélange du liquide filtré et de l'eau de lavage faisant louchir le liquide, on le laissa jusqu'au lendemain et y vit alors un petit précipité brunâtre boursoufflé facile à filtrer. Le filtré, franchement alcalin, était presque tout à fait incolore et occupait de 500 à 600 cc. Bien refroidi, il reçut peu à peu 20 cc. d'acide chlorhydrique 5-norm., ce qui fit tomber la combinaison d'isocyanate de phényle sous forme de précipité blanc caséeux, où le microscope ne montrait que des masses microcristallines. Après un repos de deux ou trois heures dans l'eau frappée, le liquide fut filtré à l'aspirateur, et le précipité déchloré par un lavage à l'eau frappée. Le rendement fut de 6^{gr},63 de substance séchée à l'air, soit près de 90 % des 7^{gr},4 calculés.

La combinaison brute était presque parfaitement pure. Presqu'insoluble dans l'eau froide, elle se laissait, bien qu'avec peine, recristalliser dans l'eau bouillante.

1 gr. de la substance fut traité, au bain d'eau bouillante, par 200 + 150 + 150 cc. d'eau, et pourtant il resta 0^{gr},65 non dissous. Un refroidissement lent des solutions obtenues, fit déposer la combinaison sous forme d'un précipité de cristaux lamellés.

¹⁾ Lavé, le précipité fut recristallisé dans l'alcool chaud et se déposa alors sous forme de beaux cristaux incolores, où le microscope montrait soit des aiguilles très minces, soit des prismes pointus et relativement épais. Le point de fusion était de 238°—239° (corr.). 0^{gr},1982 répondaient à 26 cc, 10 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (13,17 % d'azote; calculé pour la diphénylurée: 13,21 % d'azote).

La combinaison était assez soluble dans l'alcool fort, même à froid; pourtant elle se laissait très facilement recristalliser dans l'alcool de titre moyen. 6 gr. de la substance se dissolvaient en 400 + 25 + 25 cc. d'alcool à 40 %; refroidie, puis frappée, la solution déposait le composé sous forme d'un beau précipité cristallin, qui présentait au microscope une agglomération de types foliacés, dont quelques-uns ressemblaient à des feuilles mal développées, quadrilatères et d'aspect rhomboïdal. Rendement: 5^{gr},67 de matière séchée à l'air.

Les combinaisons d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne ont été tirés de l'ornithine naturelle par R. O. Herzog¹⁾, qui avait préparé cette dernière substance de l'arginine d'après la méthode de Schulze et Winterstein; de la combinaison d'isocyanate il mentionne seulement une répugnance à cristalliser.

Brute, la combinaison d'isocyanate de phényle fondait entre 185° et 190° (corr.), et recristallée, vers 192° (corr.) avec effervescence; pourtant elle se contractait à quelques degrés au-dessous du point de fusion.

Séchées à l'air, les préparations furent desséchées dans le vide sur l'acide sulfurique avant l'analyse, mais n'y perdirent presque rien de leur poids.

0^{gr},2001 de la préparation A (brute) donnaient au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 30^{cc},10 d'hyposulfite norm. au 1/14 (15,04 % d'azote, calculé 15,14 %).

0^{gr},1545 de la préparation B (brute) répondaient à 23^{cc},23 d'hyposulfite (15,04 % d'azote).

0^{gr},1412 de la préparation A (recristallisée dans l'eau) répondaient à 21^{cc},40 d'hyposulfite (15,16 % d'azote).

0^{gr},2079 de la préparation A (recristallisée dans de l'alcool à 40 %) répondaient à 31^{cc},35 d'hyposulfite (15,08 % d'azote).

0^{gr},1374 de la préparation B (recristallisée dans l'alcool à 40 %) répondaient à 20^{cc},69 d'hyposulfite (15,06 % d'azote).

0^{gr},4113 de la préparation A (recristallisée dans l'alcool à 40 %) titrés par de la phénolphthaleïne et de l'hydroxyde de baryum (0,0996 × norm.) en exigèrent 11^{cc},00, calculé 11^{cc},16.

b. Combinaison d'hydantoïne. 3 gr. de la combinaison d'isocyanate de phényle furent traités par 150 cc. d'acide chlorhydrique à 30 % dans un ballon de 400 cc. dans le bain d'huile à 140°—145°, ce qui parfit la dissolution, partiellement après une certaine fusion. L'acide chlorhydrique bouillant depuis 20 ou 25 minutes, on versa le liquide chaud dans un gobelet en verre, et le

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. XXXIV, 525 (1902).

ballon fut rincé avec 2×25 cc. d'acide chlorhydrique à 30 %. Puis, le liquide chaud fut précipité par l'addition d'eau froide, en tout 400 cc.; mais en commençant on dut n'ajouter cette eau que lentement, et il fallut bien remuer et frotter avec une baguette en verre pour empêcher que le composé d'hydantoïne donnât un précipité huileux, et l'on obtint ainsi un beau précipité blanc caséux, où le microscope présentait des groupes d'aiguilles seulement. Après deux heures de repos, le liquide fut filtré à l'aspirateur et déchloré par un lavage à l'eau froide. Rendement: 2^{gr},6 de matière séchée à l'air, soit 90 % des 2^{gr},85 de la théorie.

Pour purifier on fit dissoudre 2 gr. de la combinaison brute dans 60 + 15 + 15 cc. d'alcool absolu chaud, et le refroidissement de la solution redonna un très volumineux précipité, où le microscope montra exclusivement des aiguilles fines comme des cheveux. Complètement refroidi, le liquide fut filtré à l'aspirateur et 4 fois lavé à l'alcool. Rendement: 1^{gr},4; mais le reste put être recouvré en évaporant l'alcool et ajoutant de l'eau en même temps.

Brute, la combinaison d'hydantoïne était fusible à 192°—193° (corr.), recristallisée, entre 194° et 195° (corr.).

La combinaison d'hydantoïne tirée de l'ornithine naturelle est décrite par R. O. Herzog¹⁾ sous le même aspect et comme fondant au même point (191°—192°) (déc.) que je l'ai indiqué pour la combinaison racémique.

Avant d'analyser, on dessécha la matière dans le vide à 110°; elle n'y perdit pas de poids appréciable.

0^{gr},1387 de la préparation A (brute) donnèrent au dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 21^{cc},80 d'hyposulfite norm. au $\frac{1}{14}$ (15,72 % d'azote, théorie 15,91 %).

0^{gr},1175 de la préparation B (brute) correspondaient à 18^{cc},42 de la même solution d'hyposulfite (15,68 % d'azote).

0^{gr},1095 de la préparation A (cristallisée de nouveau) répondaient à 17^{cc},30 de la même solution d'hyposulfite (15,80 % d'azote).

0^{gr},1658 de la préparation B (recristallisée) équivalaient à 26^{cc},17 de la même solution (15,78 % d'azote).

Ce qui précède, révèle la différence suivante entre l'ornithine optiquement active étudiée par Jaffé, Schulze et Winter-

¹⁾ A l'endroit cité.

stein ainsi que Herzog, d'une part, et l'acide α - δ -diaminovalérique que j'ai préparé, d'autre part¹⁾:

1° L'acide ornithurique optiquement actif fond un peu plus tôt que l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique.

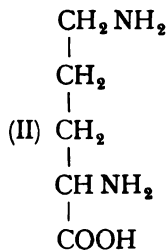
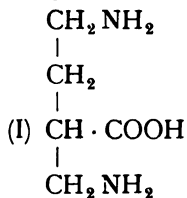
2° Le sel calcique de l'acide ornithurique est anhydre, tandis que celui de l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique contient une molécule d'eau pour chaque atome de calcium.

3° L'ornithine monobenzoylique optiquement active cristallise en aiguilles et fond tout à fait au-dessous de 240°; la préparation correspondante: le substitut monobenzoylique de l'acide α - δ -diaminovalérique racémique, cristallise en feuilles et ne fond complètement qu'entre 255° et 260°.

4° D'une part, la combinaison de l'ornithine optiquement active avec l'isocyanate de phényle ne cristallise que difficilement, et d'un autre côté, la combinaison d'isocyanate de phényle avec l'acide α - δ -diaminovalérique racémique cristallise facilement et donne des types foliacés faciles à reconnaître.

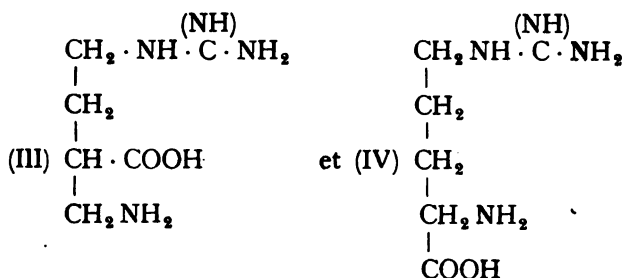
Vu la petitesse des différences en question, il se peut, il est même vraisemblable, que l'acide ornithurique de Jaffé soit une modification optiquement active de l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique; mais cette hypothèse n'est pas un fait avéré. J'ai l'intention d'en chercher une preuve en décomposant l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique racémique en ses constituants optiquement actifs, et j'emploierai à cet effet un alcaloïde convenable; c'est par cette voie que durant ces dernières années Fischer est parvenu à de beaux résultats en dédoublant des substitués benzoylés d'une série d'acides monoamidés.

La poursuite à fond de cette preuve est importante; car les faits jusqu'ici acquis se prêtent aussi bien à l'interprétation par la première que par la seconde des deux formules ci-après de l'ornithine de Jaffé:

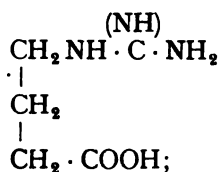


¹⁾ Quant à mes divergences d'avec E. Fischer pour l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique, voir pages 51 et 53.

Toutes deux expliquent comment Ellinger¹⁾, en se servant de bactéries de putréfaction, a pu scinder l'ornithine en acide carbonique et tétraméthylènediamine. Les deux formules correspondantes de l'arginine:



expliquent comment l'oxydation de l'arginine a pu donner à Fr. Kutscher²⁾ la formation tant de la guanidine que de l'acide guanidino-butyrique:



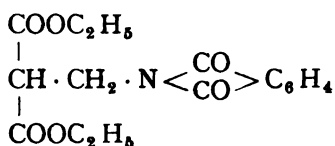
par l'oxydation ultérieure de ce dernier acide il a obtenu l'acide succinique. On est prédisposé à considérer le groupe carboxylique de l'ornithine comme lié au même atome de carbone que l'un des groupes NH_2 ; c'est naturel, car, de fait, il se produit toujours des acides α -amidés, tandis que les acides β -amidés n'ont jamais été observés avec certitude parmi les produits de la décomposition des protéines.

Il va de soi que pour préparer le susdit acide (I), qui est isomère avec l'acide α - δ -diaminovalérique, on ne peut pas employer l'éther phtalimidomalonique comme point de départ; mais j'espère que l'éther sodomalonique et le monobromométhyle-phtalimide de Franz Sachs³⁾ me feront obtenir un produit:

¹⁾ Zeitschrift f. physiol. Chemie XXIX, 334 (1900).

²⁾ Ibid. XXXII, 413 (1901).

³⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXI, 1229 (1898).

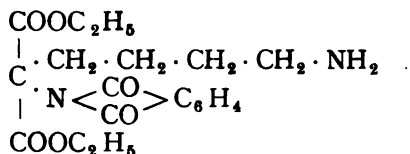


susceptible de donner naissance à cet acide comme aux acides analogues.

Appendice.

A propos de la synthèse de l'acide α - ϵ -diaminocaproïque récemment publiée par E. Fischer et F. Weigert¹⁾ et des recherches de R. Willstätter²⁾ sur les dérivés de l'acide diaminoacétique et de l'acide diaminomalonique, je terminerai par une communication provisoire concernant quelques-unes de mes recherches sur la synthèse des acides α - ϵ -diaminocaproïque et α - α -diaminoacétique.

Acide α - ϵ -diaminocaproïque. En réduisant, par le sodium brillant, une dissolution dans l'alcool absolu de l'éther butyronitrile-phthalimidomalonique décrit plus haut (voir p. 22), puis décomposant par l'acide chlorhydrique le produit de la réduction:



on a réussi facilement à obtenir le chlorhydrate de l'acide α - ϵ -diaminocaproïque; mais le rendement ne répondait pas parfaitement à l'attente. J'espère qu'en modifiant les conditions des expériences je pourrai y remédier, et alors je publierai en un ensemble mes recherches sur cette question. Ici je me bornerai à dire que pour isoler l'acide α - ϵ -diaminocaproïque, j'ai employé la méthode A. Kossel et F. Kutscher³⁾ en précipitant par l'acide phosphotungstique, puis transformant en picrate le phosphowolframate épuré par un lavage, enfin purifiant ce picrate par recristallisation en eau chaude.

Le picrate obtenu et le picrate de lysine tiré de la gélatine,

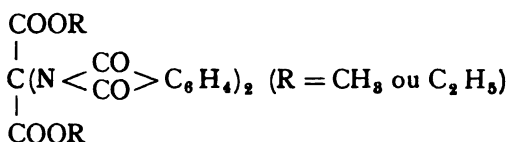
¹⁾ Sitzungsberichte der Berl. Akad. 1902, 270.

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXXV, 1378 (1902).

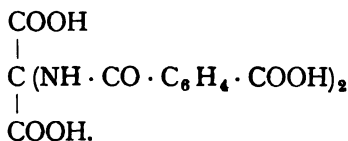
³⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. XXXI, 175 (1900).

ont fourni, d'après la méthode de Herzog¹⁾, les combinaisons d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne, et alors on a constaté des rapports analogues à ceux de plus haut (voir p. 56) à propos de l'acide α - δ -diaminovalérique et de l'ornithine. En effet, d'une part, la combinaison d'isocyanate de phényle de la lysine naturelle répond au signalement qu'en donne Herzog et ne cristallise pas volontiers, et de l'autre côté, la combinaison racémique d'isocyanate de phényle se prêtait à la cristallisation, et en recristallisant dans l'alcool à 40 0/0, elle se déposait en groupes d'aiguilles pointues, parfois un peu aplaties (fondant à env. 193° [corr.]). Les combinaisons hydantoïniques de la lysine tant « artificielle » que naturelle cristallisaient en aiguilles longues et minces, tout à fait comme l'ont décrit Herzog, Fischer et Weigert. Recristallisé dans l'alcool et séché dans le vide à 107°, le composé hydantoïnique racémique fondait à env. 187° (corr.); Fischer et Weigert lui assignent 185° (corr.). La combinaison hydantoïnique de la lysine naturelle fond d'après Herzog entre 183° et 184° (déc.); Fischer et Weigert disent: 196° (corr.), et en faisant cette préparation j'ai trouvé 194°—195° (corr.).

Acide α - α -diaminoacétique. En traitant convenablement par le phtalimide potassique le dibromomalonate de méthyle ou d'éthyle, on a produit l'éther diphtalimidomalonique:

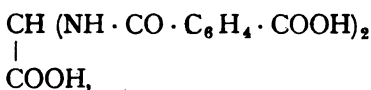


qui, dissous dans une solution d'hydroxyde de sodium ensuite sursaturée par l'acide chlorhydrique, donna l'acide tétrabasique:



Ce dernier, par simple chauffage dans une solution aqueuse, s'est scindé en abandonnant de l'acide carbonique, probablement avec formation d'une solution aqueuse de l'acide tribasique:

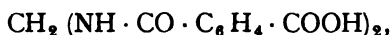
¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. XXXIV, 525 (1902).



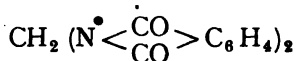
que je n'ai pourtant pas encore préparé à l'état solide. La solution aqueuse de cet acide tribasique s'est montrée fort instable; car, simplement exposée au froid, elle déposait du phtalimide. En traitant par l'acide chlorhydrique le susdit acide tétrabasique, je n'ai pas non plus réussi à produire l'acide diaminoacétique, ni mieux à constater avec pleine certitude la présence de l'acide

iminoacétique: $\begin{array}{c} \text{CH} = \text{NH} \\ | \\ \text{COOH} \end{array}$; mais je me propose de reprendre cette question.

J'y relie une recherche que j'ai commencée sur les produits de la décomposition de la solution de l'acide méthylènediphtalamique:

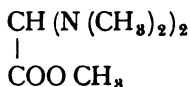


dans l'eau ou dans l'acide chlorhydrique; cet acide est facile à obtenir du méthylènediphtalimide:



découvert par A. Neumann¹⁾.

Sans entrer dans d'autres détails sur l'étude qu'on a esquissée plus haut, je me bornerai à faire remarquer certain phénomène intéressant. Après avoir trouvé que l'éther tétraméthyldiaminoacétique



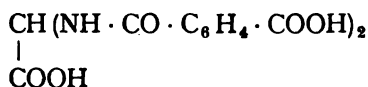
préparé par lui est très instable en contact des alcalis et des acides — contrastant ainsi avec l'acide obtenu par E. Drechsel²⁾ en dédoublant la caséine et conçu par lui comme acide diaminoacétique —, R. Willstätter³⁾ émet l'opinion que le produit de dédoublement obtenu par Drechsel ne pouvait pas être l'acide diaminoacétique. Elles aussi, mes expériences parlent dans ce sens-là; car, en songeant à l'extraordinaire facilité et spontanéité avec lesquelles les sus-mentionnées combinaisons de l'acide phtala-

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. XXIII, 1002 (1890).

²⁾ Ber. d. math.-physik. Kl. d. Kgl. Sächs. Ges. d. Wiss. 1892, 116.

³⁾ A l'endroit cité.

mique: $R \cdot NH \cdot CO \cdot C_6H_4 \cdot COOH$ se décomposent quand on les traite par l'acide chlorhydrique et forment le composé amidé $R \cdot NH_2$ et l'acide phtalique, on ne voit aucune raison pour que, traité par l'acide chlorhydrique, le susdit acide tribasique:



ne donne pas les acides phtalique et diaminoacétique, supposant que ce dernier puisse réellement, à l'instar du produit découvert par Drechsel, de la décomposition de la caséine, supporter un traitement même fort par l'acide chlorhydrique.

Messieurs mes aides Jessen-Hansen, C. Pedersen et Weis, qui m'ont diversement appuyé de leur importante assistance dans l'exécution de ce travail, sont priés de recevoir encore ici mes meilleurs remerciements.

Novembre 1902.





TABLE DES MATIÈRES

Études sur la synthèse des acides amidés par S. P. L. SØRENSEN:	1
I. Éther phtalimidomalonique	6
1. Préparation et propriétés.....	6
2. Éther phtalimidosodomalonique.....	10
II. Phénylalanine	13
1. Éther benzylphtalimidomalonique	14
2. Acide phtalamique-benzylmalonique tribasique	17
3. Phénylalanine	18
III. Acide α -aminoadipique	20
1. Éther butyronitrile- phtalimidomalonique	22
2. Acide α -aminoadipique	24
3. Acide benzoyl- α -aminoadipique	31
IV. Acide α - δ -diaminovalérique	32
1. Éther phtalimido- γ -phtalimidopropyl-malonique	34
2. Acide phtalamique- γ -propylphtalamique-malonique.....	38
3. Acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique (ou acide ornithu- rique artificiel)	44
4. Ornithurate de chaux	49
5. Acide monobenzoyle- α - δ -diaminovalérique (Monobenzoyle- ornithine)	52
6. Combinaison d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne de l'acide α - δ -diaminovalérique.....	54
Appendice	60

Carlsberg Laboratoriumet
COMPTES-RENDUS

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG

6^{me} VOLUME, 2^{me} LIVRAISON



COPENHAGUE

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP

IMPRIMERIE DE THIELE

1903

Prix: 2 Kr. 70 Øre

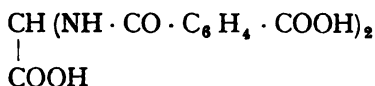
Toutes les indications thermométriques sont *centigrades*.

kgr.	kilogramme	l.	litre
gr.	gramme	cc.	centimètre cube
cgr.	centigramme	cm.	centimètre
mgr.	milligramme	mm.	millimètre
		μ .	micromillimètre

LES COMPTES-RENDUS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE CARLSBERG

paraissent par livraisons à des époques indéterminées. A mesure qu'il en paraîtra un nombre suffisant pour faire un volume, les abonnés recevront un titre en même temps qu'une table des matières, avec l'indication de la période qu'embrasse le volume.

mique: $R \cdot NH \cdot CO \cdot C_6 H_4 \cdot COOH$ se décomposent quand on les traite par l'acide chlorhydrique et forment le composé amidé $R \cdot NH_2$ et l'acide phtalique, on ne voit aucune raison pour que, traité par l'acide chlorhydrique, le susdit acide tribasique:



ne donne pas les acides phtalique et diaminoacétique, supposant que ce dernier puisse réellement, à l'instar du produit découvert par Drechsel, de la décomposition de la caséine, supporter un traitement même fort par l'acide chlorhydrique.

Messieurs mes aides Jessen-Hansen, C. Pedersen et Weis, qui m'ont diversement appuyé de leur importante assistance dans l'exécution de ce travail, sont priés de recevoir encore ici mes meilleurs remerciements.

Novembre 1902.

ÉTUDE SUR LES BACTÉRIES DITES SARCINES ET SUR LES MALADIES QU'ELLES PROVOQUENT DANS LA BIÈRE

PAR

N. HJELTE CLAUSSEN.

UN groupe des Sphérobactéries qui se rencontrent dans les brasseries, ont d'abord été décrites sous la désignation commune de Sarcina, et c'est encore sous ce nom qu'elles sont connues et redoutées aujourd'hui dans l'industrie brassicole. Plus tard, Balcke a proposé la dénomination de *Pediococcus* pour les bactéries globulaires dont le cloisonnement des cellules se fait suivant deux directions de l'espace, par opposition aux Sarcines proprement dites, dont le cloisonnement se fait dans trois directions. Dans ce qui va suivre, j'ai maintenu cette distinction; toutefois, pour ne pas m'écarter de la terminologie généralement reçue, j'ai gardé la dénomination de «maladies de Sarcina», bien que les maladies en question ne soient point dues à des bactéries pouvant être mises au nombre des Sarcines proprement dites.

Le zymologue travaillant pour l'industrie brassicole devra presque inévitablement faire face à la question des Sarcines. Or, quiconque s'occupe de cette question, ne tarde pas à reconnaître qu'aujourd'hui encore elle est pendante. Si l'on s'en tient aux manières de voir généralement admises jusqu'ici et qui s'appuient surtout sur des travaux de Lindner¹⁾, Reichard²⁾ et Schön-

¹⁾ Die Sarcina-Organismen der Gärungsgewerbe. Dissertation. Berlin 1888. Se trouve aussi dans les «Nachrichten über den Verein: Versuchs- und Lehranstalt in Berlin», 1888.

²⁾ Zeitschrift für das gesamte Brauwesen 1894, p. 257. 1895, p. 59 et 293. 1901, p. 301.

feld¹⁾ [ce dernier en a donné un aperçu dans une conférence faite en 1898 devant l'assemblée générale de la »Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei« de Berlin²⁾], on croirait que le moyen le plus facile de découvrir la source d'une contamination sarcinique, serait de faire les cultures dont il s'agit dans de l'eau de levure ammoniacale ou solutions analogues. En agissant ainsi, on trouvera presque partout: dans l'air et sur la terre, dans les poussières et dans les fumures, dans les détritits d'orge et dans le malt vert, des Sarcines et des Pédiocoques qui, il est vrai, selon les recherches faites jusqu'à ce jour³⁾, ne peuvent se développer dans la bière pasteurisée, mais qui n'en sont pas moins regardés comme susceptibles de nuire à la bière après s'y être »acclimatés«. Or, si l'état des choses était bien réellement aussi défavorable, il n'y aurait évidemment aucun moyen de tenir une brasserie à l'abri des infections: même avec la propreté la plus rigoureuse et les soins les plus méticuleux apportés à la fabrication, l'on aurait infailliblement le dessous en face d'un ennemi aussi omniprésent.

Ce sont des considérations de cet ordre qui m'ont porté à vérifier l'exactitude des opinions prédominantes et à attaquer la question par la base. Bien que le but principal que j'avais en vue fût de nature purement pratique, il m'a fallu commencer par des travaux de nature plutôt théorique. Ce sont les résultats scientifiques et pratiques obtenus dans ces recherches que je vais communiquer ci-dessous. Pour point de départ j'ai pris des bières affectées de la maladie de Sarcine, et en infectant des bières saines et pasteurisées, je me suis toujours assuré que mes cultures engendrées d'une seule tétrade étaient capables de provoquer à nouveau la même maladie. Dans mes recherches j'ai fait une distinction entre les Pédiocoques de la bière — c'est-à-dire ceux qui se développent dans la bière et peuvent la rendre malade — et, d'autre part, les autres Pédiocoques qui, il est vrai, sont semblables aux précédents au point de vue morphologique, mais qui n'ont pas d'importance pour l'industrie brassicole. De plus, j'ai pu constater l'existence d'espèces diverses

¹⁾ Wochenschrift für Brauerei 1897, p. 177. 1898, p. 285 et 321. 1899, p. 665 et 681. 1901, p. 297.

²⁾ Jahrbuch der Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin. 1898.

³⁾ Voir en particulier Schönfeld: Wochenschrift für Brauerei. 1899, p. 681.

entre les Pédiocoques de la bière. Il nous restera à appliquer la base théorique que mes recherches auront procurée, à un examen des phénomènes qui se présentent en brasserie. Cette dernière partie de ma tâche sera traitée dans un travail ultérieur.

I. Isolation des Pédiocoques qui se trouvent dans la bière et dans la levure.

Pour isoler des Pédiocoques de bière j'ai trouvé convenable de me servir de moût gélatinisé à réaction légèrement acide et que j'avais préparé en mêlant $7\frac{1}{2}\%$ de gélatine dans du moût houblonné de bière de garde marquant environ $13,5\%$ Balling. Dans ce milieu les Pédiocoques de bière se développent sûrement, bien qu'avec lenteur, et il s'agit simplement d'ensemencer sur une plaque une quantité tellement petite de la bière que parmi les taches de végétation formées avec une rapidité relative par les autres microorganismes il y ait encore assez de place pour les colonies de Pédiocoques, qui ne deviennent visibles à l'œil nu qu'au bout de 10 à 15 jours à la température ordinaire d'un appartement.

Cependant, s'il existe dans la bière des organismes qui liquéfient la gélatine ou qui en couvrent la surface, on ne pourra, règle générale, isoler les Pédiocoques au moyen d'une culture ordinaire sur plaque. Dans ce cas j'ai mis à profit le fait que les Pédiocoques de la bière sont tués moins facilement que la plupart des organismes qui les accompagnent, quand on les soumet à un traitement par des solutions aqueuses de fluorhydrate de fluorure d'ammonium. Ce sel se compose de molécules égales de fluorure d'ammonium et de l'élément qui agit en ce cas: l'acide fluorhydrique.

Abandonnées dans des verres pendant un espace de temps aussi court que $\frac{1}{2}$ heure, les solutions très faibles dont il s'agit ici, ne subissent pas d'altération sensible, tandis que, de l'autre côté, elles ont perdu le pouvoir de tuer la levure au bout de 24 heures de repos dans du verre ordinaire. Par conséquent, il faut conserver les solutions de ce sel dans des bocalx soigneusement paraffinés ou bien dans des réservoirs de gutta-percha, à moins que l'on ne préfère préparer une solution fraîche chaque

fois qu'on en a besoin. Par contre, on peut sans inconvénient laisser la solution agir sur la bière dans des bocaux ordinaires non paraffinés, parce que l'effet qu'on a en vue se produit déjà au bout de très peu de temps.

Le procédé ci-après a paru mener au but: On mélange en remuant, dans un bocal, des volumes égaux de bière renfermant des Pédicoques et d'une solution de fluorhydrate de fluorure d'ammonium à 1—1½ %. Puis, on laisse reposer pendant ½ heure à la température ordinaire du laboratoire, après quoi une goutte de ce mélange est disséminée dans du moût gélatinisé. Au bout de 7 ou 8 jours à une température de 25 ° C., ou après 10 à 15 jours à celle de la chambre, les Pédicoques, s'il y en a, auront formé dans la gélatine des taches visibles, qui même pendant un séjour prolongé demeurent toutes petites. Parmi les autres organismes qui se rencontrent généralement dans la bière, certaines espèces de *Torula* et de bactéries en forme de bâtonnets peuvent, il est vrai, survivre au traitement par le fluorure d'ammonium; mais dans aucun des cas considérés leur nombre n'a été assez grand pour empêcher une isolation commode des Pédicoques.

Le procédé a été vérifié sur les bières suivantes, qui toutes avaient séjourné en bouteilles pendant quelque temps et renfermaient en abondance de Pédicoques à côté de divers autres microbes:

N ^o	Sortes de bière	Développements sur la gélatine:
1	Bière danoise de garde	Exclusivement des Pédicoques
2	Bière de Munich	Quelques rares bâtonnets, des Pédicoques en grand nombre
3	Bière de Dortmund	Un nombre minime de bâtonnets, de nombreux Pédicoques
4	Bière du type de Munich, brassée aux États-Unis d'Amérique	Bâtonnets et Pédicoques
5	Double Brown Stout, de Londres	Quelques rares <i>Torula</i> , de nombreux Pédicoques

On a transporté dans de la bière pasteurisée une colonie de Pédicoques obtenue de cette manière, en prenant garde à ce que la colonie ne fût pas englobée dans la gélatine. Au bout

de 2 à 3 semaines à la température de la chambre, elle a produit dans la bière des phénomènes morbides analogues à ceux qu'on avait constatés dans l'échantillon original de bière. Les Pédiocoques des cinq bières indiquées ci-dessus peuvent se classer en deux groupes:

Les Pédiocoques originaires des N^{os} 1 et 5, donnaient à la bière une odeur et un goût désagréables, mais ne la rendaient pas trouble. Ils croissaient au fond de la bouteille, où ils formaient un dépôt insignifiant.

Ceux provenant des N^{os} 2, 3 et 4, causaient la même altération de l'odeur et du goût de la bière, mais la troublaient en même temps; car ils apparaissaient durant une certaine phase en forme de tétrades isolées suspendues dans le liquide.

Ainsi que nous en parlerons dans la suite, les 5 Pédiocoques isolés se sont maintenus constants tant au point de vue de leur action sur la bière que sous d'autres rapports aussi, et nous pouvons en distinguer deux espèces bien nettement différentes auxquelles, en considération de la façon dont elles se comportent vis-à-vis de la bière, j'ai donné les noms de *Pediococcus damnosus* (N^{os} 1 et 5) et *Pediococcus perniciosus* (2, 3 et 4).

Vu que le traitement par le fluorhydrate de fluorure d'ammonium dont je viens de parler, s'est trouvé applicable à l'isolation de Pédiocoques provoquant des maladies dans la bière et provenant de cinq bières arbitrairement choisies et différant beaucoup par leurs provenance et caractère, on peut regarder comme probable que tous les vrais Pédiocoques de la bière ordinairement trouvés dans ce liquide font preuve du même pouvoir relatif de résistance au fluorhydrate de fluorure d'ammonium.

Le procédé que je viens de décrire s'adapte éminemment à séparer les Pédiocoques d'avec les levures, puisque celles-ci sont tuées très facilement par le fluorure susdit. Conséquemment, le cas échéant, on est en état de constater avec sûreté même une très légère infection par des Pédiocoques, quand elle se produit soit dans un appareil propagateur de la levure, soit dans une cuve de fermentation. Dans ce dernier cas on peut délayer 2 à 3 g. de levure épaisse comme

la bouillie dans un bocal non paraffiné contenant 10 cc. d'une solution de fluorhydrate de fluorure d'ammonium à $\frac{1}{2}\%$, et la laisser reposer pendant $\frac{1}{2}$ heure, après quoi l'on en transporte 2 ou 3 gouttes dans le moût gélatinisé. Pourvu que l'on ait eu soin de répartir complètement la levure dans le liquide en remuant fortement, on n'obtient dans la gélatine qu'un développement de Pédiocoques. J'ai eu mainte occasion de me convaincre de la précision de cette méthode. Elle permet de constater aisément l'existence de Pédiocoques dans la levure en quantités tellement minimes que même par un examen rigoureux au microscope un observateur expérimenté ne peut pas les découvrir. Bien entendu, ce procédé demande trop de temps pour être applicable par exemple au choix de levure d'ensemencement de cuve en cuve; mais toutes les fois qu'il s'agit de constater si un échantillon de levure est parfaitement exempt de Pédiocoques, ou bien de poursuivre une infection naissante, ladite méthode rend de bons services et doit toujours être employée.

Un examen provisoire ayant montré que les 5 Pédiocoques se laissent classer dans les deux espèces mentionnées plus haut, j'ai choisi pour objet d'une recherche plus approfondie l'espèce provenant de la bière de garde danoise et celle provenant de la bière de Dortmund. Ces représentants de chacune des deux espèces ont fourni de quoi préparer des cultures absolument pures, c'est-à-dire des cultures préparées en prenant pour point de départ une seule tétrade contrôlée au microscope. La difficulté que présente une telle culture pure de bactéries, à cause de l'extrême petitesse des individus, se trouve ici supprimée en partie par suite de la forme bien nettement caractéristique de la tétrade et, de plus, on peut atténuer cette difficulté en ne prenant pour chaque opération qu'une dose de gélatine infectée assez petite pour être contenue dans un seul champ du microscope.

La végétation de *Pediococcus* provisoirement isolée par le procédé décrit ci-dessus ayant rendu la bière pasteurisée malade par infection, on en a transporté une quantité convenable dans du moût gélatinisé fondu; les amas de Pédiocoques renfermés dans cette portion de bière avaient été préalablement bien secoués afin de disjoindre les tétrades dont ils étaient formés. La dilution a été réglée de façon qu'une toute petite gouttelette renfermât, en terme moyen, une tétrade seulement, et une série

de ces petites gouttes ont été placées à la surface inférieure de leurs couvre-objet respectifs et examinées au microscope. Alors, quand on n'a trouvé dans une goutte qu'une tétrade d'aspect typique, et une seule, on a marqué l'emplacement de cette goutte à la face supérieure du couvre-objet, et on l'a recouverte d'une goutte plus grosse de moût gélatinisé et stérilisé, justement en train de se solidifier, après quoi on a luté le couvre-objet à l'anneau de la chambre humide. Dans certaines chambres la tétrade ne s'est pas développée du tout, et d'autres ont dû être rejetées parce que des *Pédiocoques* m'avaient échappé, de sorte que plus d'une colonie s'est développée; mais dans les chambres restantes la tétrade marquée a développé une tache de végétation, et cette tache a permis d'infecter à coup sûr un milieu nutritif frais. La division cellulaire a commencé au bout de 3 ou 4 jours à la température de la chambre, et les colonies sont devenues visibles à l'œil nu dans la huitaine. Une pareille colonie a fourni des matériaux pour une culture par piqûre en moût gélatinisé, et à l'aide de celle-ci on a d'abord infecté les autres milieux nutritifs.

II. Morphologie.

Je n'ai pu amener ni *Pediococcus damnosus* ni *Pediococcus perniciosus* à prendre la forme propre aux *Sarcines*. Quelles que soient les conditions extérieures et les milieux nutritifs dans lesquels je les ai cultivées, les deux espèces que je viens de nommer ont toujours apparu dans les mêmes formes que la bière nous montre, c'est-à-dire des tétrades et des dyades. Quand une tétrade isolée dans du moût gélatinisé commence à se scinder, il s'opère bien vite des déplacements tellement considérables entre les cellules que le tout se façonne en un amas confus de forme essentiellement globulaire, dans lequel il est impossible de suivre le développement des cellules individuelles.

D'un côté, je n'ai pu observer aucune agglomération régulière; de l'autre, les préparations provenant de cultures faites dans des milieux liquides présentent ordinairement des amas irréguliers formés par un nombre variable de tétrades et de dyades groupées d'une façon assez confuse. C'est dans leur tendance plus ou moins marquée à former de pareils amas qu'il faut chercher un

caractère distinctif entre la végétation de *Pediococcus damnosus* et celle de *Pediococcus perniciosus*. Le premier possède cette tendance à un haut degré, tandis qu'elle manque, ou peu s'en faut, dans l'autre. Voilà précisément la cause de la façon différente dont ils se comportent en croissant dans la bière.

La différence se manifeste non seulement dans les bières, mais aussi d'une manière très nettement prononcée dans le moût houblonné. Si l'on infecte avec le *Pediococcus damnosus* un pareil moût contenu dans un flacon *Freudenreich* et qu'on laisse le flacon en repos sans le secouer, il s'y formera au fond de petits amas aux contours nettement définis, bien qu'un peu irréguliers. Ces amas croissent tant en hauteur que latéralement, et finissent par ressembler à de petites verrues. Le moût lui-même demeure limpide pendant plusieurs jours après l'apparition des amas. Il est vrai que plus tard il se trouble; mais loin d'être dû à des *Pédiocoques* nageant dans le liquide, ceci est au contraire le résultat d'une production d'acide. Si l'on neutralise cet acide au fur et à mesure qu'il se forme, le moût ne s'altère point, mais demeure tout à fait clair.

Quant au *Pediococcus perniciosus*, il se comporte tout autrement. Dès le commencement de son développement, cette espèce produit dans le moût un trouble très prononcé en l'emplissant d'une foule de tétrades et dyades qui flottent librement, et il en est ainsi même si l'on neutralise l'acide qui s'est formé. En même temps il se forme au fond du flacon des taches plates et étendues sans contours bien définis et qui n'atteignent pas de hauteur appréciable. Ces taches se soudent peu à peu en croissant de manière à former une couche homogène et uniformément répandue.

Dans d'autres liquides nutritifs on rencontre des divergences analogues, bien que moins fortement accusées, dans le mode de croissance de ces deux espèces.

Une jeune culture du *Pediococcus damnosus* dans du moût est formée d'amas irréguliers, se composant souvent d'innombrables tétrades et dyades, tandis que le *Pediococcus perniciosus* apparaît ou en forme de tétrades et dyades isolées ou bien comme amas d'une étendue beaucoup moins grande. L'agglutinant qui les retient ensemble, n'est pas dissout par les acides dilués, mais il l'est facilement par les alcalis en dilution. Si, prenant une goutte de lessive de soude étendue, on la fait

entrer dans une préparation de *Pediococcus damnosus*, on verra qu'au fur et à mesure que la lessive pénétrera, tous les amas se désuniront pour s'éparpiller comme des tétrades et dyades isolées. Il en est de même dans une préparation de *Pediococcus perniciosus*, quoique à un degré moindre, soit parce que les amas sont plus petits, soit aussi parce que la matière qui les cimente semble se dissoudre moins complètement, de telle sorte qu'après l'addition de la lessive on trouve encore de petits amas de 2 à 4 tétrades chacun.

Quant aux tétrades, elles paraissent, en moyenne, un peu plus grandes dans le *Pediococcus damnosus* que dans le *Pediococcus perniciosus*. Cependant, la différence d'un côté des tétrades des deux espèces est tellement exigüe — seulement 0,1 à 0,2 μ — qu'elle ne nous fournit pas de caractère distinctif, d'autant moins que la grandeur peut varier considérablement dans la même espèce selon le mode de culture. C'est ainsi que dans le *Pediococcus damnosus* le côté de la tétrade a affecté par exception une longueur de 1,8 μ d'une part et de 3,5 μ de l'autre, alors que le chiffre ordinaire est de 2,6 à 2,8 μ .

Le *Pediococcus perniciosus* montre un phénomène caractéristique dans des cultures vieilles. Un examen microscopique du dépôt des cultures en moût âgées de 3 mois ou plus, fait découvrir dans l'une et l'autre espèce une foule de corpuscules granuleux, les uns des *Pédiocoques* morts, d'autres des sécrétions du moût, sans qu'il soit possible de les rapporter avec certitude par une observation directe à l'une ou l'autre de ces deux catégories. Si, par contre, on fait entrer sous le bord du couvre-objet un peu de lessive de soude diluée, les sécrétions provenant du moût se dissoudront. Une préparation de *Pediococcus damnosus* est donc encore remplie d'une foule de tétrades isolées, tandis que dans une préparation de *Pediococcus perniciosus* on n'observe généralement plus de corps solides, ou tout au plus quelques rares corpuscules plus réfringents que le liquide. Par conséquent, dans des cultures en moût de *Pediococcus perniciosus* âgées de 3 mois, les cellules se sont transformées au point que par un traitement à la lessive de soude elles se dissolvent tout simplement. Par contre, les cultures du *Pediococcus damnosus* dans le moût, même après 8 mois de repos, ne montrent aucune trace d'une pareille transformation.

Dans certaines circonstances, qu'on trouvera indiquées ci-dessous, les deux espèces de *Pediococcus* qui nous occupent, affectent la forme de zooglées.

III. Physiologie.

Tant le *Pediococcus damnosus* que le *Pediococcus pernicius* se développent dans les liquides nourriciers légèrement acides ou neutres ordinairement employés. L'une et l'autre espèce peuvent également se développer dans des liquides assez fortement acides. Si, au contraire, le liquide nutritif contient un alcali libre, même en proportion minime, tout développement se trouve enrayé.

La façon dont les deux espèces se comportent vis-à-vis de la bière, présente un intérêt tout particulier. J'ai pasteurisé à 60° dans des bouteilles de $\frac{1}{4}$ l. et munies d'un fermoir métallique à arc. Il est assez commode d'opérer avec de telles bouteilles; car elles permettent de nettoyer à la flamme tant le bouchon que le goulot, et ensuite de les ouvrir dans la caisse stérile sans toucher autre chose que le levier du fermoir. En effet, le bouchon est soulevé par la pression de l'acide carbonique. Puis, lorsque la bière a été infectée, on peut également avec facilité fermer la bouteille sans qu'il y ait chance de contamination étrangère. Tant le *Pediococcus damnosus* que le *Pediococcus pernicius* se développent sans difficulté dans la bière pasteurisée de la manière indiquée. Lorsque j'ai effectué l'infection par des cultures jeunes dans du moût houblonné ou non houblonné ou bien dans un mélange de ces liquides avec de la gélatine, elle n'a jamais manqué, et même faite avec des végétations tirées des cultures en eau de levure ou en bouillon additionné de peptone, elle a réussi généralement, bien que pas toujours. Cependant, dans les cas les plus favorables, le développement met une quinzaine de jours à se manifester d'une façon bien nette, parfois même 5 à 6 semaines. En secouant fréquemment les bouteilles, on favorise à un haut degré le développement.

Ainsi que je l'ai déjà dit, le *Pediococcus pernicius* commence par ternir un peu la bière, puis la trouble plus ou moins, jusqu'à ce qu'un repos prolongé ait amené une nouvelle clarification. Par contre, le *Pediococcus damnosus* laisse la bière claire

et ne produit qu'un petit dépôt assez insignifiant. L'une et l'autre espèce communiquent ordinairement à la bière les mêmes goût et odeur désagréables; toutefois, comme cela était à attendre, ceux-ci ne sont pas prononcés au même degré dans toutes les bières, et il en existe même dans lesquelles ils sont tout-à-fait imperceptibles. En se développant dans de telles bières, ce n'est que le *Pediococcus perniciosus* qui y provoque des phénomènes morbides; l'autre espèce ne le fait point.

Comme on le sait, il a été établi plusieurs fois par des chercheurs très exacts que des bactéries qui s'accordent tout-à-fait morphologiquement avec celles dont nous nous occupons, peuvent apparaître sur une grande échelle dans les brasseries sans provoquer de maladie dans la bière. J'ai trouvé la confirmation de cette observation dans mes recherches. En effet, j'ai pu constater que le *Pediococcus damnosus* peut exister abondamment par ex. dans la «bière de Pilsen» d'une grande brasserie danoise sans faire aucun mal à la bière, tandis que cette même espèce produisait des phénomènes manifestes de maladie (odeur et goût mauvais) dans une bière similaire d'une autre brasserie. Cela fait donc voir et apprécier l'aptitude de la bière elle-même à déterminer si la maladie se manifestera ou non.

Nous avons vu qu'il peut s'écouler des temps inégaux avant que de différentes cultures d'un seul et même *Pediococcus* se développent sensiblement dans la bière. Les cultures tirées du moût s'y développent plus vite que celles provenant de l'eau de levure ou du bouillon additionné de peptone, et les cultures jeunes évoluent plus rapidement que les anciennes. Il peut naturellement arriver aussi qu'en raison de son âge ou du mode de culture employé, une culture n'arrive point du tout à se développer dans une bière; mais pourvu qu'un développement ait lieu, le résultat final est toujours essentiellement le même pour une seule et même sorte de bière. Quel que soit le temps qu'il y faille, le *Pediococcus perniciosus* rendra toujours la bière trouble, si tant est qu'il puisse s'y développer. Une bière peut se troubler plus qu'une autre; mais une seule et même bière ne présente pas à cet égard de plus grandes différences que ne le feront aussi sous d'autres rapports les contenus de deux bouteilles ayant la même bière.

Les opinions prédominantes relatives à la «virulence» chan-

geante des *Pediococcus* vis-à-vis de la bière, me semblent donc ne pouvoir pas s'appuyer sur les faits constatés.

La notion de «virulence» a été empruntée au domaine des bactéries pathogènes, et par analogie des phénomènes qu'il nous montre, l'apparition des *Pédiocoques* à l'état «virulent» ou «non virulent» signifierait qu'un seul et même *Pédiocoque*, qui en certains cas provoque certains phénomènes morbides par sa croissance dans une bière quelconque, devait dans d'autres cas (soit quand on l'a cultivé d'une autre manière) pouvoir croître dans la même bière sans la rendre malade. Mais je n'ai rien pu constater de pareil, et aucune autre source non plus n'a, que je sache, fourni des bases sûres qui nécessitent d'admettre une variabilité de la «virulence» des *Pédiocoques* de bière; du moins en est-il ainsi après la découverte d'espèces différentes dans ce groupe de microbes.

En fait de liquides nourriciers, j'ai employé encore du moût houblonné (marquant respectivement 13,5 % Balling et 7 % Ball.), du moût non houblonné (12 % Ball.), de l'eau de levure légèrement acide, du bouillon de boeuf additionné de peptone, et de la décoction de foin. Par occasion, j'ai aussi essayé des décoctions de fumier de cheval. Les *Pédiocoques* évoluent plus ou moins vigoureusement dans tous ces milieux. C'est le moût houblonné qui est à préférer, ce milieu étant celui qui se trouve en brasserie à côté de la bière. Pourtant, dans des buts particuliers, soit lorsqu'il s'agit de déterminer la faculté d'acidification ou bien de décider si telle culture est encore en vie, il vaudra mieux employer le moût non houblonné, parce que la croissance dans ce dernier a lieu le plus rapidement. En effet, un moût non houblonné, infecté de jeunes cultures de *Pediococcus perniciosus* et de *Pediococcus damnosus*, a manifesté des signes de développement au bout de respectivement 3 et 5 jours, alors que pour le moût houblonné il s'écoulait, toutes conditions égales d'ailleurs, respectivement 5 et 7 jours. Règle générale, le *Pediococcus perniciosus* se développe un peu plus vite que le *Pediococcus damnosus*.

Les *Pédiocoques* de la bière produisent des acides dans les liquides nutritifs renfermant des hydrates de carbone. Dans 10 cc. de moût non houblonné (12 % Ball.) le *Pediococcus perniciosus* a produit comme maximum une quantité d'acide correspondant à 6^{cc},4, de lessive de soude normale au dixième, tandis que le

Pediococcus damnosus n'en donne qu'une quantité correspondant à 4^{cc},8 de lessive de soude normale au dixième.

On peut neutraliser l'acide à mesure qu'il se forme, en plaçant au fond du flacon une couche de carbonate de chaux précipité. Alors dans les cultures de *Pediococcus damnosus*, le liquide qui se trouve en dessus, se maintiendra limpide tant qu'il y reste encore de la chaux non dissoute, tandis qu'il est, comme à l'ordinaire, terni par le *Pediococcus pernicius*. Il est toutefois à remarquer que l'une et l'autre espèce se développent sensiblement moins facilement dans le moût non houblonné neutralisé par le carbonate de chaux qu'elles ne le font dans le moût non houblonné ordinaire. Parfois, et assez souvent, le développement n'a pas du tout lieu. Le mieux est de stériliser le carbonate de chaux à part sous l'eau, d'en ajouter ensuite, avec les précautions nécessaires, une quantité au moût stérilisé, et d'abandonner celui-ci à lui-même jusqu'à ce que la chaux se soit précipitée, avant de l'infecter.

Quant à la façon dont les *Pédiocoques* de bière se comportent vis-à-vis des liquides nutritifs alcalins, les résultats auxquels je suis arrivé sont en contradiction directe avec les opinions dominantes, suivant lesquelles ce ne serait ni le moût ni la bière, mais au contraire l'eau de levure ammoniacale qu'on devrait préférer comme milieu nutritif pour les analyses relatives aux microbes en question.

En dépit d'une multitude d'expériences, je n'ai jamais pu amener aucune de mes espèces provoquant de la maladie dans la bière et cultivées à l'état de pureté à se développer dans des liquides à réaction alcaline, et il m'a été autant impossible d'y obtenir un développement de *Pédiocoques* par inoculation directe de bière atteinte de la «maladie de Sarcine». J'ai cherché à réaliser les meilleures conditions possible pour la croissance des *Pédiocoques* en variant l'alcalinité des liquides nutritifs, laquelle a du reste été minime dans tous les cas; de plus, en variant la température, la tension de l'oxygène et le mode de culture préalable des matériaux d'infection, — le tout avec un résultat négatif. Entre mes séries d'essais, j'en citerai une seule, qui présente un intérêt tout particulier:

Du moût non houblonné, de l'eau, de levure et du bouillon additionné de peptone furent sursaturés d'ammoniaque et stérilisés dans des flacons Freudreich. Après la stérilisation, les trois

liquides montraient une réaction alcaline faible, mais pourtant bien prononcée. Alors ils ont été infectés de *Pédiocoques* développés dans divers liquides nutritifs. Un certain nombre des flacons infectés, abandonnés à l'action de l'air, n'ont montré au bout de 5 semaines aucun développement de microorganismes. Une autre série de flacons ont été placés sous une cloche, qu'on vida d'air jusqu'à une pression de mercure de 100 mm., et qu'ensuite on remplit d'acide carbonique jusqu'à rétablissement de la pression atmosphérique. Au bout de 12 jours, on constata un développement dans ces flacons; mais en même temps la réaction, d'alcaline qu'elle était, était devenue neutre pour l'eau de levure et pour le bouillon additionné de peptone, nettement acide pour le moût non houblonné. Pour s'expliquer cet état de choses, on pourrait se figurer que les *Pédiocoques* de bière croissent réellement dans des liquides alcalins, pour peu que la tension de l'oxygène soit suffisamment faible, et que durant la croissance ils forment un acide qui neutralise l'alcali. Cependant, cette possibilité se trouve exclue par le fait que dans une troisième série de flacons, dans lesquels pour raréfier l'oxygène on a employé de l'hydrogène au lieu de l'acide carbonique, il ne s'est produit aucun développement. C'est donc l'acide carbonique qui dans l'expérience ci-dessus décrite a neutralisé l'alcali, et c'est seulement alors que la croissance des *Pédiocoques* de bière est devenue possible. Il va de soi qu'une pareille possibilité se produit aussi quand on ajoute à des liquides nutritifs légèrement alcalins une quantité telle des matériaux d'infection ordinairement assez acides (par ex. de la bière infectée de *Sarcine*) qu'après cette addition le mélange n'ait plus de réaction alcaline. Lorsque dans les cultures effectuées par piqure dans des gélatines nourricières alcalines ou par épanchement à leur surface, on observe que les *Pédiocoques* de bière croissent extrêmement peu et pour peu de temps, il faut probablement de même l'expliquer en admettant que l'alcali a été neutralisé sur tel point et momentanément par les matériaux acides d'infection.

Une tension d'oxygène inférieure à celle de l'atmosphère est, règle générale, la plus favorable à la croissance des *Pédiocoques* de bière. Cependant tout dépend tant de la nature du milieu nutritif que de la température. En vue d'examiner de plus près cette question, j'ai infecté, dans des flacons Freudenreich, divers liquides nutritifs, puis je les ai placés

sous une cloche, où j'ai fait un vide partiel et introduit ensuite de l'acide carbonique ou de l'hydrogène. J'ai fait une comparaison de ces flacons avec des flacons parallèles abandonnés à l'action de l'air atmosphérique à la même température, et constaté qu'à des températures comprises entre 18° et 25° les deux espèces de *Pediococcus* se sont développées dans le moût (houblonné ou non houblonné) au moins aussi vigoureusement quand les flacons étaient exposés à l'air que lorsque la tension d'oxygène avait été diminuée. Aux températures basses, bien que le développement soit lent dans tous les cas, il est sensiblement plus actif quand la tension est réduite que si elle est normale.

Pour éclaircir cet état de choses, je vais citer une expérience sur le *Pediococcus damnosus* dans du moût non houblonné. Les chiffres indiquent l'augmentation d'acide dans 10 cc. de moût non houblonné, exprimée en cc. de lessive de soude normale au dixième.

Pediococcus damnosus. Augmentation d'acide dans 10 cc. de moût non houblonné.

Age de la culture en jours	Air atmosphérique		Air atmosph. (700 mm.) + CO ₂ (660 mm.)	
	25 °	5 à 7 °	25 °	5 à 7 °
14	2,6	0,1	2,9	0,7
21	3,1	0,1	2,9	0,7
28	3,1	—	3,1	—
37	3,2	0,4	3,0	1,8

Pour les cultures dans du bouillon additionné de peptone et notamment dans de l'eau de levure, la diminution de la tension de l'oxygène s'est trouvée favoriser à toutes les températures le développement.

Même si l'oxygène est exclu aussi complètement que possible (par ex. par stérilisation des liquides, refroidissement avec insufflation d'acide carbonique pur, rapide infection, puis introduction continuelle de cet acide), les *Pédiocoques* de bière arrivent à évoluer. D'autre part, une tension considérablement plus élevée que la tension normale, m'a donné un développement dans le moût, mais non dans le bouillon additionné de peptone, ni dans l'eau de levure.

La température la plus favorable à la croissance des *Pédi-*

coques de bière semble être comprise entre 23° et 24° . Mais si l'on veut prolonger ces cultures, il est préférable de travailler à des températures plus basses, soit à la température ordinaire de la chambre. En effet, les cultures s'affaiblissent très sensiblement avec l'âge, et cet affaiblissement est plus marqué encore à des températures plus élevées. L'exemple suivant pourra servir à élucider cet état de choses.

Une culture de *Pediococcus damnosus*, âgée d'environ 3 semaines, dans du moût non houblonné, fut transportée dans du moût houblonné, où elle donna un développement manifeste au bout de 13 jours à une température de 25° , tandis qu'à 19° elle ne le donna qu'au bout de 17 jours. Ces cultures ayant atteint l'âge de 4 semaines, on a infecté par chacune d'elles deux nouveaux flacons au moût, l'un à 25° et l'autre à 19° . Les cultures en 2^e génération seront désignées, d'une manière aisée à comprendre, comme suit: (25,25), (25,19), (19,25) et (19,19). Pour qu'un développement nettement prononcé se déclarât dans (25,25), il fallut 10 jours, pour (25,19) 26 jours, pour (19,25) 6 jours, et pour (19,19) 11 jours. On a infecté de même de nouveaux flacons au moût par les cultures en 2^e génération âgées de 3 semaines. Ceux-ci ont fait preuve de développement dans (25,25,25) au bout de 8 jours, dans (25,25,19) au bout de 18 jours; (19,19,25) a pris 5 jours, et (19,19,19) 7 jours.

On voit que la température la plus élevée donne toujours le développement le plus rapide, mais aussi, à un degré très sensible, le plus grand affaiblissement.

En somme, au bout d'un temps assez limité, les cultures de *Pédiocoques* de bière dans le moût ne sont plus capables de se développer, même quand on leur offre les conditions les plus favorables. C'est ainsi que dans le moût le *Pediococcus perniciosus* était déjà mort après environ 2 mois d'exposition à la température du laboratoire, alors que le *Pediococcus damnosus* a pu rester vivant dans des cultures en moût âgées de 3 mois, mais avait succombé dans une culture de 7 mois. Dans la bière pasteurisée, l'une et l'autre espèce restent en vie pendant 10 mois environ, le *Pediococcus damnosus* probablement encore plus longtemps.

Aucune des deux espèces ne liquéfie les gélatines nutritives. Elles s'y maintiennent en vie relativement longtemps. Ainsi, même après 5 mois d'exposition à la température de la chambre,

on a trouvé vivante une culture par piqûre dans du moût gélatinisé du *Pediococcus pernicius*, celle des deux espèces en question qui généralement résiste le moins.

Si l'on transporte dans de l'eau distillée et stérilisée quelques gouttes du dépôt produit, dans une bière pasteurisée, par les deux espèces de *Pediococcus* dont nous nous occupons, il se produit bien vite une formation caractéristique de zooglé. En secouant le dépôt, on constate qu'il est formé d'assez gros flocons détachés, et le microscope montre les *Pédiocoques* éparpillés au hasard dans un mucilage incolore dont on peut tout juste entrevoir les contours. Ce mucilage n'est attaqué ni par les alcalis ni par les acides, de même que ni l'iode ni les couleurs anilines ne le colorent. Contrairement à cette formation, qui s'est produite invariablement lorsque j'ai transporté dans l'eau des cultures faites dans la bière, je n'ai rien pu constater d'analogue pour les cultures faites dans d'autres milieux nutritifs.

Parmi les divers antiseptiques et moyens de lavage usités en brasserie, l'alcool (à 93 % et même à 50 %) et l'antiformine exercent sur nos *Pédiocoques* de bière une action sûrement fatale, même si l'on fait agir lesdits désinfectants pendant moins d'un quart d'heure. Le bisulfite semble donner des résultats pareils; toutefois, les recherches concernant l'action de cette substance n'ont pas été suffisamment poussées à bout pour permettre de donner des chiffres bien sûrs. L'acide tartrique à divers titres a été essayé sur le *Pediococcus damnosus*, et l'on a obtenu les résultats que voici: Une solution à 15 % exerce une action mortelle en 1 heure, mais non en $\frac{3}{4}$ heure. Pour une solution à 5 %, la limite de l'action qui tue à coup sûr se trouve entre 3 et 4 heures, et à 0,6 % la solution agit mortellement en 12 heures, mais non en 7 heures.

De ce qui précède, il ressort déjà qu'on a tant soit peu surfait l'action délétère qu'exercent sur les *Pédiocoques* de la bière les moyens de lavage contenant de l'acide fluorhydrique. Une solution à 1 % de fluorhydrate de fluorure d'ammonium, agissant pendant une heure, n'a tué ni *Pediococcus damnosus* ni *Pediococcus pernicius*, et il en est de même d'une solution à 2 % de montanine (solution aqueuse à 24 %, presque pure, d'acide fluosilicique).

S'agit-il d'estimer la valeur pratique des moyens de lavage pour l'industrie brassicole, il va sans dire qu'on doit tenir compte

non seulement de leur pouvoir de tuer les *Pédiocoques*, mais encore de leur faculté de dissoudre les sécrétions et enveloppements de diverse nature qui en maint cas seraient susceptibles d'empêcher une action efficace. Sous ce dernier rapport, c'est l'antiformine qui l'emporte de beaucoup sur tous ses analogues, alors que par ex. l'alcool, loin de dissoudre les sécrétions présentes, sera plutôt capable d'en causer de nouvelles.

IV. Récapitulation et Remarques finales.

Les plus importants des résultats qu'ont donnés les expériences décrites dans ce qui précède, peuvent se résumer dans les thèses suivantes:

1° La maladie dite de Sarcine, qui affecte la bière, est causée par certaines espèces de *Pediococcus*. Les cultures absolument pures de celles-ci, issues d'une tétrade unique contrôlée au microscope, croissent sans difficulté dans le moût de bière et dans la bière pasteurisée.

2° Pour séparer les *Pédiocoques* de la bière d'avec la levure ainsi que d'avec la plupart des autres microorganismes qui se trouvent dans la bière, on peut se servir de faibles solutions aqueuses de fluorhydrate de fluorure d'ammonium, auxquelles les *Pédiocoques* de bière résistent relativement bien.

3° Il existe au moins deux espèces de *Pédiocoques* de bière, à savoir, d'une part, le *Pediococcus damnosus*, qui communique le plus souvent à la bière une odeur et un goût désagréables et qui ne forme qu'un dépôt insignifiant en soi, — et, d'autre part, le *Pediococcus perniciosus*, qui non seulement altère le goût et l'odeur de la bière, mais la trouble entièrement¹⁾.

4° Une seule et même culture pure de *Pediococcus* provoque au cours de sa croissance dans une même bière toujours essentiellement les mêmes phénomènes morbides.

¹⁾ Le laboratoire de Carlsberg a fourni des cultures des deux espèces de *Pediococcus* au laboratoire de M. Král à Prague.

5° Il est des sortes de bière dont telle est la nature que le *Pediococcus damnosus* peut y apparaître en abondance sans causer aucune maladie.

6° Les Pédiocoques de bière croissent dans le moût houblonné ainsi que dans les autres liquides nutritifs acides ou neutres généralement en usage, tandis que l'alcali libre, même en quantité minime, empêche d'une manière radicale tout développement. L'eau de levure ammoniacale, dont on a tant préconisé l'emploi pour la constatation de la présence de Sarcines, est parfaitement impropre à servir pour les recherches en brasserie.

7° Aux températures moyennes (15° à 25°), les Pédiocoques de bière, dans un liquide favorable comme le moût, sont assez indifférents vis-à-vis de l'oxygène, pouvant croître, d'une part, quand l'oxygène est complètement exclu et, d'autre part, lorsque la tension de l'oxygène dépasse de beaucoup celle de l'oxygène atmosphérique.

L'intérêt dont on entoure la question relative aux Pédiocoques, est dû sans doute avant tout aux dégâts que fait « la maladie de Sarcine » dans probablement tous les pays du monde où l'on fabrique de la bière. Mais, indépendamment de ce fait, la question qui nous a occupés présente un intérêt tout particulier pour le zymologiste, en ce sens qu'elle a occasionné assez d'incertitude et de tâtonnements relativement aux principes fondamentaux de l'analyse microbiologique de l'air et de l'eau des brasseries.

Le principe que Emil Chr. Hansen a formulé, et suivant lequel, dans les recherches microbiologiques à faire pour les brasseries, il faut se servir des liquides nutritifs mêmes dont le brasseur fait usage, — ce principe a été contesté par divers auteurs justement à cause du problème de « la maladie de Sarcines » (voir p. ex. P. Lindner, *Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben*, 2te Aufl. 208 (1898).) On a affirmé, en effet, que la bière et le moût houblonné ne sont pas propres à servir de milieux

nourriciers pour les Pédiocoques de bière, et l'on a préconisé l'emploi d'eau de levure ammoniacale pour constater la présence desdits microbes. Or, les résultats obtenus dans les expériences que je viens de communiquer, font voir que ni l'une ni l'autre assertion ne sont soutenables. Dans mes expériences je me suis laissé guider par le principe précité de Hansen, de même que les méthodes indiquées par ce savant ont toujours formé la base de mes procédés. C'est conformément à ces méthodes que j'ai employé principalement, comme milieux nutritifs, le moût houblonné et la bière, milieux qui se sont trouvés on ne peut mieux appropriés à la culture et à la définition des Pédiocoques de la bière.

Il serait un peu hors de propos d'entamer ici une mention plus détaillée des diverses circonstances qui ont déterminé l'établissement des opinions opposées. Quant à une seule de celles-ci, savoir le fait que dans les analyses d'air et d'eau, avec du moût et de la bière comme milieux nourriciers, on n'a pu trouver de Pédiocoques de bière que par pure exception, j'espère pouvoir y revenir dans un travail ultérieur.

Juillet 1903.

UNE ESPÈCE NOUVELLE DE SACCHAROMYCES:
SACCH. SATURNUS KLÖCKER,
AYANT DES SPORES CARACTÉRISTIQUES

PAR

ALB. KLÖCKER

DANS le »Centralblatt f. Bakteriologie, Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten«, 2te Abt., VIII. 129 (1902), j'ai donné une communication provisoire et sommaire sur une espèce nouvelle de *Saccharomyces* dont les spores diffèrent notablement de celles de tous les autres *Saccharomyces* connus jusqu'ici. Cette espèce nouvelle se rattache aux levures qui se groupent autour du *Saccharomyces anomalus* Hansen. Seulement, tandis que les spores de cette dernière espèce sont en forme de chapeau avec un filet saillant partant de la base, celles de la levure découverte par moi sont ceintes, autour du centre, d'un filet saillant de sorte que par un faible grossissement elles rappellent les images communes de la planète de Saturne. C'est pourquoi j'ai donné à cette levure le nom de *Sacch. Saturnus*.

On sait que ce qui caractérise tout particulièrement le *Sacch. anomalus* et les espèces et races qui s'y rapprochent, est

- 1^o La formation rapide de voile sur le liquide;
- 2^o Le filet saillant des spores, — et enfin
- 3^o La production d'éther.

Le *Sacch. Saturnus* développe tout d'abord sur le moût de bière un voile blanc et ridé, et en même temps il se forme de la levure de dépôt. Dans un voile jeune les cellules (voir fig. 1) sont de forme globulaire ou ovoïde. Leur taille varie de 4μ à 6μ environ. Si on laisse reposer une culture pendant quelque temps, les cellules s'agrandissent un peu; la plupart affectent la

forme sphérique et se remplissent de nombreuses gouttes de graisse (voir fig. 2). En même temps, le voile va grossissant, l'acide carbonique développé par la fermentation forme de grosses bulles, et la couleur devient plus jaunâtre. Dans une pareille culture en moût, laquelle avait séjourné pendant 1 $\frac{1}{2}$ année à la température du laboratoire, les cellules avaient atteint une grandeur de jusqu'à 7 μ ; à côté de celles-ci, il s'en trouvait aussi de beaucoup moins grandes et de forme allongée.

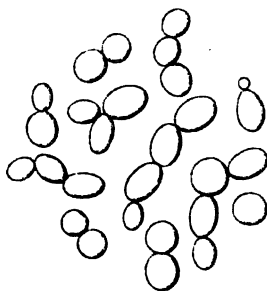


Fig. 1. Sacch. Saturnus. Cellules d'un voile formé depuis 24 heures, à 25°, sur du moût de bière. Env. 1000/ μ .

Si l'on secoue la culture de manière à faire aller au fond une partie du voile, les vieilles cultures finissent par former un voile plus ou moins muqueux. Tel a été le cas par exemple pour des cultures en moût de bière dans des flacons Freudenreich et âgées d'un an environ. Dans ce voile muqueux il apparaissait de nombreuses cellules de grandeur démesurée, soit d'un diamètre d'environ 10 μ et plus; elles étaient vidées et avaient les parois épaisses (voir fig. 3). A côté d'elles, on pouvait observer quelques autres cellules moins grandes et renfermant des gouttes graisseuses.

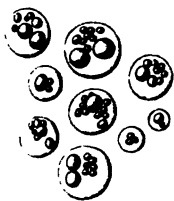


Fig. 2. Sacch. Saturnus. Cellules, renfermant des gouttes graisseuses, d'un voile d'env. 3 semaines sur du moût de bière. Température du laboratoire. Env. 1000/ μ .

Secouées, les cultures en moût de bière produisent aussi des ceintures de levure sur les parois du verre. Les cellules dont ces ceintures sont formées, ressemblent à celles des voiles d'un certain âge: elles sont principalement de forme sphérique, et beaucoup d'entre elles renferment des spores. Ici aussi, on a pu constater l'existence de cellules gigantesques, comme celles que je viens de mentionner.

La forme et l'apparence des cellules varient un peu selon le milieu nourricier, comme cela est le cas pour les Saccharomycètes en général.

Sur la bière de garde, le voile était formé principalement de petites cellules rondes d'un diamètre d'environ 3 à 4 μ .

Sur l'eau de levure, il se forme rapidement un voile

recouvrant toute la surface et qui se compose de petites cellules rondes.

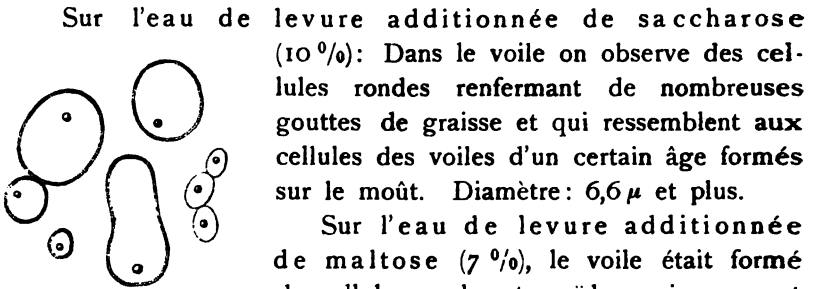


Fig. 3. *Sacch. Saturnus*. Cellules gigantesques d'un voile d'env. un an sur du moût de bière. A droite, trois cellules de taille normale. Temp. du laboratoire. Env. $1000/1$.

Sur l'eau de levure additionnée de saccharose (10 %): Dans le voile on observe des cellules rondes renfermant de nombreuses gouttes de graisse et qui ressemblent aux cellules des voiles d'un certain âge formés sur le moût. Diamètre: $6,6\mu$ et plus.

Sur l'eau de levure additionnée de maltose (7 %), le voile était formé de cellules rondes et ovoïdes, qui souvent avaient presque toutes formé des spores. La grandeur était, en moyenne, d'env. $4,6\mu$.

Sur l'eau de levure additionnée de dextrose (10 %) et sur l'eau de levure additionnée de lévulose (5 %), le voile se composait le plus souvent de cellules rondes, ovoïdes et oblongues, renfermant des gouttes d'huile. Sur ces milieux, les cellules forment généralement des colonies plus ou moins grandes (voir fig. 4), tandis que sur les liquides précédents elles sont le plus souvent isolées ou groupées deux par deux.

Sur l'eau de levure additionnée d'arabinose (5 %), les cellules du voile sont petites, ovoïdes ou rondes, vidées, sans gouttes de graisse.

Les cellules produites sur l'eau de levure additionnée de lactose, elles aussi, sont petites, ovoïdes ou rondes.

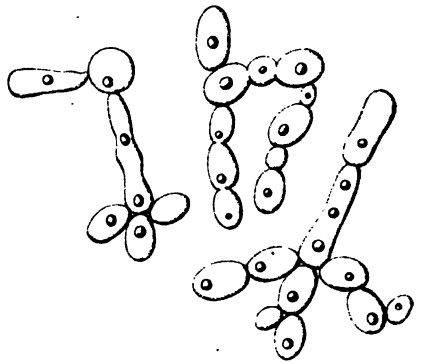


Fig. 4. *Sacch. Saturnus*. Cellules d'un voile de trois mois sur de l'eau de levure additionnée de dextrose. Temp. du laboratoire. Env. $1000/1$.

Sur le moût gélatinisé, le *Sacch. Saturnus* forme bientôt des colonies blanches ou d'un jaune pâle et dont la surface est sillonnée de rides; leur forme ressemble communément à celle d'un cratère. Les cellules de ces colonies sont généralement

de forme sphérique et renferment de nombreuses gouttes d'huile; grandeur de ces cellules: env. $6,6\mu$, parfois davantage. Peu à peu, la partie centrale de la colonie s'enfonce de plus en plus, parce que la gélatine se liquéfie lentement.

Par contre, sur la gélatine mélangée de bouillon additionné de peptone, les cellules sont petites et souvent un peu allongées. La croissance est très lente dans ce milieu. L'aspect de la colonie est essentiellement le même que sur le moût gélatinisé.

Les limites de température du bourgeonnement sur le moût de bière dans les flacons Freudenreich, se trouvent entre 2 à 4°C . et 35 à 37°C ., l'optimum se trouvant vers les 28° à 30°C . Pour les déterminer, j'aiensemencé, à des températures différentes, une trace d'une jeune végétation de voile sur la surface du moût de bière contenu dans un flacon Freudenreich.

La formes des spores est un peu variable. Elle rappelle le plus souvent celle d'un citron; mais quelquefois les pointes sont un peu recourbées et indistinctes. Les spores sont toujours ceintes, autour du centre, d'un filet saillant plus ou moins marqué¹⁾ (voir fig. 5). Dans leur intérieur se trouve un corpuscule globulaire fortement réfringent, vraisemblablement de nature adipeuse; car si l'on traite les spores par une solution d'hydrate de chloral ($2\text{ g. d'hydrate de chloral} + 1\text{ g. d'eau}$), le contour de ces corpuscules disparaît conformément avec les gouttes grassieuses des cellules ordinaires.

La longueur des spores, mesurée de pointe en pointe, est généralement d'env. 3μ ou un peu plus; la plus grande largeur est d'env. 2μ . On voit le plus souvent 2 spores dans une cellule, moins fréquemment 3, plus rarement 1, et le plus rarement 4. Je n'en ai jamais observé un plus grand nombre.



Fig. 5. Sacch. Saturnus. Cellules, pourvues de spores, d'un voile sur de l'eau de levure additionnée de maltose. Env. 1000/1.

¹⁾ Dans ma communication provisoire, précitée, dans le »Centralbl.«, j'ai décrit la forme des spores comme »un globe aplati et ceint d'un filet saillant«. Tel est, en effet, généralement leur aspect dans les cultures sur blocs de plâtre, les pointes étant très minces et indistinctes. Mais dans mes recherches ultérieures je suis arrivé à reconnaître que la forme est plutôt celle d'un citron; c'est surtout dans les cultures produites sur l'eau de levure additionnée de maltose qu'elle se dessine le plus nettement.

Dans les cultures sur blocs de plâtre d'après la méthode Hansen, cette espèce produit en général facilement des spores. Les limites de température sont comprises entre 4 à 7° C. et 28 à 31 $\frac{1}{2}$ ° C., l'optimum se trouvant vers les 25° C. A cette dernière température, les spores se produisent au bout de 43 heures environ.

Comme il se présentait des cas où le *Saccharomyces* nouveau donnait une sporulation plus abondante sur l'eau de levure additionnée de maltose que sur les blocs de plâtre, j'ai fait des essais de culture sur ce liquide, afin de déterminer dans ces conditions les limites de température, que je me figurais pouvoir être différentes de celles trouvées par la culture sur les blocs de plâtre. Il n'en fut pourtant rien: elles étaient identiques à celles indiquées ci-dessus.

Il ressort donc de ces expériences que la température minima de la sporulation est de quelques degrés plus élevée, et le maximum de quelques degrés plus bas que les températures correspondantes du bourgeonnement. Nous trouvons donc chez cette espèce aussi une confirmation de la loi découverte par Hansen pour l'évolution des organes de reproduction en question (*Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg*, II. 106 (1886), et V. 68 (1902)).

Sur d'autres milieux encore, il se forme des spores en abondance. Tel est l'eau de levure additionnée de maltose mentionnée plus haut et où, après quelque temps de repos, le voile est souvent formé presque exclusivement de cellules sporogènes. (Sur l'eau de levure additionnée de, respectivement, dextrose, lévulose, saccharose, arabinose et lactose, je n'ai jamais observé de spores dans le voile.) Sur le riz aussi, il se produit une abondance de spores. On en a trouvé également dans les ceintures de levure sur les parois du verre et dans les voiles des cultures en moût, ainsi que dans les végétations âgées et liquéfiées sur le moût gélatinisé.

Pour pouvoir déterminer et classer de telles cellules de levure, il est important de connaître la manière dont s'opère la germination des spores. Dans le cas présent la question serait de savoir si les spores de l'espèce nouvelle germent ou non de la même manière que celles des véritables *Saccharomyces*, savoir par bourgeonnement. Pour m'en rendre compte, j'ai pris pour point de départ un voile formé sur l'eau de levure addi-

tionnée de maltose, ce milieu étant celui qui pourrait me fournir le plus aisément des éléments d'ensemencement composés exclusivement de cellules sporogènes. Dans une chambre Ranvier fermée, renfermant du moût de bière étendu servant de liquide nutritif, voici comment la germination s'est faite à la température du laboratoire: Dans l'espace de 12 heures environ, la spore a perdu son brillant, le filet saillant a disparu, et les dimensions ont augmenté (fig. 6), la forme devenant plus ou moins globoïde. Maintenant, la spore a présenté une certaine ressemblance à une cellule de levure à parois épaisses, apparemment sans autre contenu qu'un seul grain fortement resplendissant. Une seule partie de la paroi était dans la plupart des cas plus épaisse et plus réfringente que le reste. Alors j'ai vu les spores germer par bourgeonnement de la même manière que

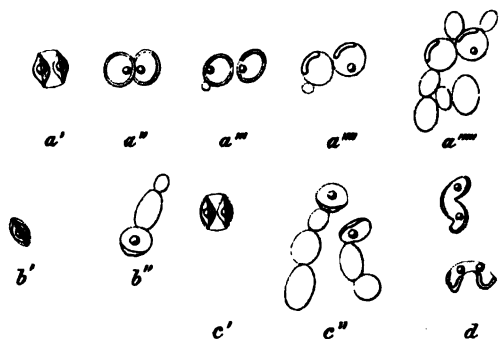


Fig. 6. Sacch. Saturnus. Des spores en germination dans du moût de bière étendu, dans une chambre Ranvier. a' une cellule renfermant 2 spores; a'' au bout de 13 $\frac{1}{2}$ heures, a''' au bout de 18 $\frac{1}{2}$ heures, a'''' au bout de 19 $\frac{1}{2}$ heures, a''''' au bout de 28 $\frac{1}{2}$ heures, b' une cellule à 1 spore; b'' au bout de 18 heures. c' une cellule à 2 spores; c'' au bout de 18 heures. d des spores fusionnées.

Env. 1000/ μ .

celles des Saccharomyces proprement dits. Dans plusieurs cas, j'ai observé deux spores qui s'étaient fusionnées (fig. 6, d), phénomène qui, d'après les recherches de Hansen, n'est point rare dans les Saccharomycètes.

En ce qui concerne l'action du Sacch. Saturnus sur les divers sucres, il se distingue bien nettement du Sacch. anomalous en possédant la faculté d'intervertir le saccharose, et de faire fermenter ensuite le sucre interverti. Il peut aussi faire fermenter le raffinose. Dans le moût de bière il provoque une fermentation lente, avec peu d'écume. Au bout de 46 jours, il ne s'était produit à 25° C. qu'environ 1 % en volume d'alcool dans un ballon Pasteur de $\frac{1}{1}$ l. contenant du

moût houblonné ordinaire (d'une densité d'env. 14 % Ball.) pour la bière de garde.

En même temps qu'il se produit de l'alcool, il se forme aussi de l'éther, qui se manifeste par une odeur fortement prononcée. En distillant le moût fermenté, on obtient un liquide qui sent fortement l'éther acétique. En ceci, mon espèce concorde donc avec le *Sacch. anomalus*, où W. Seifert a constaté la formation de cet éther. Les cultures en eau de levure additionnée de lévulose sentaient fortement l'éther de poires.

Si, pendant un long espace de temps, on laisse reposer une culture en moût couverte de son voile, l'alcool qui s'est produit disparaît. L'odeur d'éther disparaît aussi complètement, faisant place à une odeur aigrelette particulière. C'est ainsi qu'une culture en moût qui était exposée depuis 1½ année à la température du laboratoire, ne contenait plus d'alcool après examen fait au moyen de l'ébullioscope. Probablement l'alcool qui s'était formé avait été transformé par oxydation.

Pour ce qui concerne la durée de la vie de mon espèce, je n'en sais que peu de chose, attendu qu'elle n'est sujet de mes recherches que depuis deux années environ. Pendant toute cette période, elle s'est maintenue en vie dans une solution de saccharose et dans du moût de bière. Une végétation sur bloc de plâtre exposée pendant 8 mois à une température de 3 à 4 ° C. sans produire de spores, était encore en vie après ce laps de temps, et a formé par ensemencement dans du moût à 25 ° C., déjà au bout de 2 jours, un voile recouvrant toute la surface du liquide.

Le *Sacch. Saturnus* a été découvert pour la première fois dans des échantillons de terre pris dans l'Himalaya et que M. F. A. Möller, à Darjeeling, a eu l'obligeance de me faire parvenir. Plus tard, j'ai trouvé cette espèce, ou en tout cas un type qui s'y rapproche de très près (je n'ai pas eu l'occasion d'approfondir dans tous les détails l'examen des cultures ci-après), et dans de la terre danoise et dans de la terre italienne, de même que mon collègue M. Schiönnig l'a rencontrée plusieurs fois dans des échantillons de terre de la même provenance.

Le Laboratoire de Carlsberg a fourni cette espèce au laboratoire de M. Král à Prague.

Ce qui précède peut se résumer dans la description suivante :

Sacch. Saturnus Klöcker.

Forme rapidement un voile blanc et ridé sur le moût de bière et sur d'autres liquides nutritifs sucrés.

Cellules rondes ou ovoïdes, rarement, mais quelquefois, oblongues; longueur ordinaire: 4 à 6 μ .

Limites de température du bourgeonnement sur le moût: 2 à 4 ° C., et 35 à 37 ° C.

Spoires en forme plus ou moins régulière de citron, et ceintes d'un filet saillant autour du centre de pointe à pointe, longues d'env. 3 μ , renfermant un corpuscule globoïde et réfringent (de nature adipeuse?). Optimum de leur formation sur bloc de plâtre est voisin de 25 ° C., le minimum est compris entre 4 et 7 ° C., et le maximum entre 28 et 31 $\frac{1}{2}$ ° C.

Fait fermenter les dextrose, lévulose et raffinose, et intervertit le saccharose pour faire fermenter ensuite le sucre interverti. En même temps que la fermentation, il y a formation d'un éther (éther acétique?). Ne fait pas fermenter les maltose, lactose et arabinose.

A été découvert dans de la terre prise dans l'Himalaya. La même espèce, ou en tout cas une espèce très voisine, a été observée dans de la terre danoise et de la terre italienne.

Août 1903.

SUR LA CLASSIFICATION DU GENRE PENICILLIUM, ET DESCRIPTION D'UNE ESPÈCE NOUVELLE FORMANT DES ASQUES

PAR

ALB. KLÖCKER.

ON sait que diverses espèces du genre de *Penicillium* se rencontrent très fréquemment dans la nature et aussi dans les différentes localités des brasseries. Dans celles-ci les céréales et le malt en sont attaqués et, de plus, elles apparaissent sur les foudres, parois etc., bref, partout où il y a de l'humidité, leurs exigences relatives à la nourriture étant des plus modestes. En outre, la bière mise en bouteilles peut prendre un goût et une odeur désagréables par suite de la présence de *Penicillium*, par ex. quand cette moisissure a infecté le bouchon. Pour le vin, il a été démontré par Wortmann que le goût particulier qu'il prend parfois dans certaines circonstances et qui est nommé en allemand »Stopfengeschmack«, est dû à des champignons appartenant à ce genre. Les espèces qui le constituent sont donc au nombre des organismes dont l'importance pour l'industrie zymotechnique est assez considérable. Elles ont aussi joué un certain rôle dans l'histoire des erreurs scientifiques, en ce sens qu'autrefois on a cru, à tort, trouver parmi elles les types primitifs de la levure.

Il n'y a que peu d'espèces de ce genre qu'on a bien caractérisées jusqu'ici; les descriptions données sur la plupart d'entre elles sont tellement défectueuses qu'on ne saurait les identifier. La position systématique du genre *Penicillium*, elle aussi, a été vivement débattue, et elle a été changée plus d'une fois. Dans

ce qui va suivre, je me propose aussi de fournir une contribution à la classification du genre *Penicillium*.

L'espèce qui a été décrite la première, est le *Penicillium crustaceum* L. (*P. glaucum* Link), dénomination qui cependant, comme on l'a reconnu plus tard, comprend plusieurs espèces. Ce qui caractérise toutes les espèces de *Penicillium*, c'est la formation de conidies, et pendant longtemps on n'a connu chez le *Penicillium* que cette reproduction végétative. C'est seulement en 1872 que Brefeld¹⁾ a constaté que le *Penicillium glaucum* est à même de produire une forme supérieure de fructification, à savoir les asques, découverte qui a classé ladite espèce dans les Ascomycètes. Ayant constaté en outre que cette formation d'asques est précédée d'une production de scléroties — vu que c'est dans l'intérieur de ceux-ci que les asques prennent naissance —, Brefeld a rangé le *Penicillium glaucum* parmi les Tubéracées, famille de champignons chez laquelle les asques se forment précisément dans l'intérieur de corps ressemblant aux scléroties. Cependant, ainsi que nous le verrons ci-dessous, on a plus tard découvert d'autres espèces de *Penicillium* où les scléroties font défaut, les asques se formant sans production préalable de scléroties. Plus tard, Brefeld n'a rien énoncé, que je sache, sur la classification de *Penicillium*; mais dans la »Vergleichende Morphologie der Pilze« publiée en 1892 par F. v. Tavel, ce genre est rapporté aux Périssporacées, famille que cet auteur met à côté des Tubéracées et Erysiphées comme coordonnées à celles-ci. Je suppose que c'est aussi l'opinion actuelle de Brefeld que v. Tavel, son disciple et collaborateur, exprime ainsi; car dans la préface de l'ouvrage cité il est dit que l'auteur se propose de donner un aperçu non seulement des recherches de Brefeld, mais encore de son jugement.

Cependant, certains des types rapportés au *Penicillium glaucum* d'après l'aspect de la végétation conidienne paraissent être incapables de produire la fructification supérieure dont il s'agit. Tel est p. ex. le cas des types trouvés ici en Danemark et examinés au Laboratoire de Carlsberg. Pas une seule fois nous n'avons pu parvenir à les amener à produire des asques, quoique ayant suivi de point en point le mode de culture indiqué par Brefeld. Le procédé recommandé par Zukal et que nous avons également essayé, savoir culture sur des écorces d'oranges

¹⁾ Brefeld, Entwicklungsgeschichte von *Penicillium* (Botan. Ztg., 1872).

douces ou de citrons, ne nous a pas donné de résultats positifs non plus.

Van Tieghem, en 1876, a fait la communication assez intéressante¹⁾ qu'il avait découvert une espèce nouvelle de *Penicillium*: *P. aureum*, qui produisait des asques sans formation préalable de scléroties. Au reste, van Tieghem est d'avis que la formation de scléroties ne peut pas, de soi, servir de marque distinctive prouvant une relation générique. Selon lui, elle est de nature plutôt physiologique que morphologique, car elle peut exister ou manquer, selon les conditions de croissance, chez des espèces d'un seul et même genre et, qui plus est, chez des individus d'une seule et même espèce. Nous y reviendrons plus bas. Ce qui est plus important en ce cas, c'est son observation de la formation d'asques chez le *Penicillium aureum* mentionné plus haut et dont, ainsi que nous l'avons vu, les asques se forment directement, sans formation préalable de scléroties. En même temps van Tieghem décrit une espèce nouvelle de *Gymnoascus*: *G. rubrum*, qui forme ses asques tout à fait de la même manière que le *Penicillium aureum*, de même qu'ils se ressemblent sous d'autres rapports aussi. La différence qui détermine le classement des deux espèces dans différents genres, se trouve uniquement dans la fructification conidienne. Aussi, dans son «*Traité de Botanique*», il place les deux genres dans une seule et même tribu sous la famille des Périsporacées.

Zukal²⁾, en 1889, a décrit, sous le nom de *Penicillium luteum*, une troisième espèce qui forme des asques et dont, selon lui, on ne saurait contester le caractère de *Gymnoascus*. Il croit pouvoir affirmer que le genre de *Penicillium* doit être classé dans la famille de *Gymnoasci*.

De plus, une description de l'espèce mentionnée plus haut a été donnée par Wehmer³⁾ qui, abordant la question de sa classification, déclare qu'il préfère rapprocher le genre de *Peni-*

¹⁾ Van Tieghem, Sur le développement de quelques Ascomycètes (Bull. de la Soc. botan. de France, XXIV, 157 (1877)).

²⁾ H. Zukal, Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen aus dem Gebiete der Ascomyceten (Sitzungsber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. in Wien. Math.-Naturw. Cl. XCVIII, 561, (1889)).

³⁾ Wehmer, Morphologie und Entwicklungsgeschichte von *Penicillium luteum* Zuk., eines überaus häufigen grünen Schimmelpilzes (Ber. d. Deutsch. bot. Ges., 1893).

cillium des Erysiphées, Eurotiées et Tubéracées, plutôt que des Gymnoascées. Deux années plus tard, ce même savant¹⁾ décrit une espèce nouvelle: le *Penicillium italicum*, qui se distingue en formant des scléroties à l'instar du *P. glaucum*; mais, par opposition à cette dernière espèce, il ne se développe pas d'asques dans l'intérieur de ces scléroties: les scléroties restent simplement à l'état de scléroties.

Mentionnons enfin que dans la »Kryptogamen-Flora von Schlesien« de Cohn, III, Pilze, 220 (1893), Schröter indique un *Penicillium insigne* (Winter). Sous cette appellation il désigne l'Eurotium insigne distribué par Winter dans les »Fungi Europæi exsiccati«, Cent. XVIII, de Rabenhorst, et dont la fructification conidienne serait le *Gliocladium penicillioides* Corda. Wehmer²⁾ fait la même affirmation, tandis que Lindau³⁾ est d'avis que le *Gliocladium* n'a rien à faire avec le *Penicillium*. Edw. Fischer⁴⁾, outre les trois espèces de *Penicillium* formant des asques et mentionnées plus haut, cite aussi le *P. insigne* (Winter).

On verra donc par ce qui précède qu'après la découverte des ascospores il y a eu, et qu'il y a encore aujourd'hui, des opinions contraires sur la classification du *Penicillium*. C'est ce qui rend désirables des contributions nouvelles pouvant mener à la vraie conception.

Autant que je sais, on ne connaît jusqu'ici que quatre espèces, tout au plus, de *Penicillium* capables de former une fructification par asques, et une espèce qui forme des scléroties mais non des asques, tandis que toutes les autres n'ont que la fructification conidienne⁵⁾. Les quatre espèces qui forment

¹⁾ Wehmer, Beiträge zur Kenntnis einheimischer Pilze. II. 68. (1895). L'année précédente, W. avait donné dans le »Hedwigia« une description sommaire de cette espèce.

²⁾ Hedwigia, XXXIII. (1894).

³⁾ Engler & Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien, I, 1^{ste} Abt. ** (1900).

⁴⁾ *ibid.* I., 1^{ste} Abt. (1896).

⁵⁾ Lindau (à l'endroit cité) dit que le nombre total des espèces décrites jusqu'ici de ce genre se monte à 46. Dans son »Essai de revision du genre *Penicillium* Link« (Ann. de la Soc. scientif. de Bruxelles, XXV. (1901)), Fr. Dierckx décrit 25 espèces de *Penicillium*. Entre celles-ci il n'y a que 3 des espèces connues auparavant. Chez aucune d'elles il ne parle d'une fructification par asques; toutes ses descriptions ne sont basées que sur la

des asques peuvent facilement être distinguées les unes des autres. Ainsi que nous l'avons vu, le *P. glaucum*, par opposition aux trois autres, forme d'abord des scléroties. Les ascospores du *P. luteum* sont munies de filets saillants et transversaux; chez le *P. aureum* les ascospores sont lisses, tandis que chez le *P. insigne* elles sont hérissées de piquants courts et émoussés; chez cette dernière espèce elles sont aussi très grandes (larges de 16 à 20 μ). Or, je suis parvenu à découvrir une cinquième espèce formant des asques et qui a l'aspect d'un *Gymnoascus*, surtout du *Gymnoascus flavus*¹⁾, abstraction faite de la fructification par conidies, qui est la même que chez un *Penicillium* type, et je peux essentiellement confirmer les affirmations de van Tieghem et de Zukal relatives à la place du genre *Penicillium* dans le système, pour ce qui concerne les espèces qui développent des asques sans formation préalable de scléroties: Leur place naturelle se trouve dans la famille des *Gymnoascées*, à côté du genre *Gymnoascus*.

Nous arrivons maintenant à la question de savoir où il faut classer les autres espèces rapportées jusqu'ici au genre *Penicillium*. La marque commune à toutes les espèces, c'est l'appareil conidien; mais ce caractère, à lui seul, ne peut être considéré comme suffisant pour réunir les espèces sous un même genre, quand la fructification supérieure: la formation d'asques, est aussi différente qu'elle l'est dans le cas présent. En effet, c'est la fructification supérieure à laquelle les classificateurs s'en tiennent de préférence. Tant que du *Penicillium glaucum* on ne pourra pas trouver aussi des individus capables de produire des asques sans formation préalable de scléroties, il faut admettre qu'ici

couleur des végétations et sur diverses dimensions mesurées. On peut en dire autant du «Prodrome d'une flore mycologique obtenue par la culture sur gélatine préparée de la terre humeuse du Spanderswoud, près de Bussum» (Archives néerlandaises des Sciences exactes et naturelles, Série 2, VII. (1901)) de C. A. J. A. Oudemans & C. J. Koning. Ici, 4 espèces nouvelles sont décrites et figurées: mais les descriptions sont très sommaires, et d'une fructification par asques il n'est rien dit. Conséquemment, il est impossible de dire si parmi tous ces types de *Penicillium* il se trouve des espèces formant des ascospores. On n'y parle non plus d'essais de culture à cet égard.

¹⁾ Alb. Klöcker, *Gymnoascus flavus* n. sp. (Hedwigia, XLI. 80. (1902), et Botanisk Tidsskrift, XXV. 49. (1902)).

le développement de scléroties est absolument nécessaire; nous ne pouvons, à l'instar de van Tieghem, nous en consoler en pensant que chez certains genres de champignons ce développement peut, dans les individus d'une même espèce, tantôt faire défaut, tantôt se produire; il est impossible d'en faire abstraction; la conséquence en serait qu'alors on ne pourrait pas attribuer à la formation d'asques non plus aucune importance pour la classification, attendu qu'elle a précisément une grande tendance à faire défaut.

Le *Penicillium glaucum* doit donc jusqu'à nouvel ordre constituer un genre à part qui, conformément à l'opinion de Brefeld et v. Tavel, doit se ranger sous les Périssporacées et à côté des Erysiphées et Tubéracées. Par contre, les autres espèces à formation d'asques et sans développement de scléroties doivent, comme nous l'avons vu, être rapportées aux Gymnoascées. Enfin, quant à toutes les autres, au sujet desquelles nous ne savons pas si elles forment ou non des asques, il faut provisoirement les compter parmi les »Champignons imparfaits« (*Fungi imperfecti*), jusqu'à ce qu'on ait découvert une fructification supérieure. Il va de soi que la même règle s'applique aux types qui ne produisent que des scléroties sans donner d'asques.

L'état actuel des choses ne m'invite pas à introduire de nouveaux noms génériques. Dans le cas où de nouvelles recherches feront voir que la classification que je viens d'indiquer se vérifie dans son ensemble, ce qu'il y aura de plus naturel sera de garder le nom générique de *Penicillium* pour les espèces classées parmi les *Fungi imperfecti*. Il faudrait alors donner à l'espèce traitée par Brefeld: *P. glaucum*, un nouveau nom générique, tandis que les espèces qui développent des asques sans formation préalable de scléroties et que, à l'exemple de Zukal, je compte parmi les Gymnoascées, devront ou constituer un nouveau genre appartenant à cette famille, à côté du *Gymnoascus*, ou bien simplement être admises dans ce genre. Je garderai pourtant provisoirement le nom de *Penicillium* pour l'espèce nouvelle découverte par moi et qui va être décrite.

Le professeur et docteur Wortmann de Geisenheim sur-le-Rhin, dont les travaux de microbiologie et de fermentation du vin sont si célèbres, a englobé dans ses études, comme on l'a déjà dit, le traitement des rapports du *Penicillium* au vin.

D'après lui, je désignerai cette nouvelle espèce sous le nom de *Penicillium Wortmanni*.

Je l'ai déjà plusieurs fois trouvée dans des échantillons de terre pris soit en Danemark, soit en Italie, soit dans l'Himalaya. J'en ai trouvé trois ou quatre variétés qui dans certains sens se comportent un peu différemment, par ex. en ce qui concerne le rapport de la formation de conidies à celle des asques; mais dans l'ensemble il y a concordance entre elles.

Ces variétés ont toutes été trouvées dans d'épaisses couches de diverses moisissures, qui se formaient quand des matras renfermant un mélange de terre et de moût de bière ont séjourné assez longtemps. Alors on y a vu des végétations de mycelium jaune mêlé de corpuscules arrondis, feutrés, qui sont les amas d'asques. En général, il n'y a eu en même temps aucune formation de conidies, ou bien elle a été très faible, et la première fois que j'ai rencontré cette espèce, je l'ai prise immédiatement pour le *Gymnoascus flavus* précédemment décrit par moi, ou une espèce voisine. Cependant, en l'isolant et la cultivant à l'état de pureté dans des conditions diverses, je suis parvenu à susciter à volonté soit une végétation riche en conidies, soit une végétation presque exclusivement composée de mycelium et d'asques. La première se produit sur d'épaisses couches de moût gélatinisé, l'autre, par ex., par ensemencement dans des flacons Freudreich renfermant de minces couches de moût étendu. J'ai, en outre, semé les ascospores dans une chambre humide et étudié leur développement jusqu'à formation de conidies. Autant à l'oeil nu qu'au microscope, on trouve à une végétation exclusivement composée d'asques et de mycelium exactement le même aspect qu'à certaines espèces de *Gymnoascus*. Les amas d'asques sont entourés d'un tissu lâche d'hyphes tout à fait analogue à celui qu'on rencontre chez les *Gymnoascus*, et les ascospores ont exactement la même apparence que celles du *G. flavus*. L'unique différence qui reste, est donc que le *P. Wortmanni* a la végétation conidienne typique qui est propre au *Penicillium* mais absente chez le *G. flavus*. Dans le cas de cette dernière espèce on voit simplement apparaître de temps en temps, au sein même du liquide qui sert de milieu de culture, des conidies un peu oblongues et limpides comme l'eau, et ces conidies sont disposées en chapelets, partant de branches courtes, qui ont de

l'analogie avec un stérigme¹⁾. D'après Wehmer, les asques n'apparaissent pas régulièrement chez le *P. luteum*. Je peux pleinement confirmer ce résultat. En effet, soit en employant les matériaux fournis dans le temps à notre laboratoire par M. Zukal, soit en me servant d'une culture due à M. Wehmer (et qui nous avait été envoyée par le laboratoire de M. Král de Prague), je n'ai jamais pu obtenir un développement d'asques dans cette espèce, ni même dans les conditions où ces organes se produisent facilement chez le *P. Wortmanni*. Chez cette dernière espèce, en effet, il en est tout autrement. Quand on en sème, soit des conidies, soit des ascospores, dans un flacon Freudenberg renfermant une mince couche (soit six gouttes) de moût de bière étendu, et qu'on abandonne cette culture à un repos quelque peu prolongé (6 jours ou plus), il se produit une végétation jaune ou rougeâtre et qui se compose presque exclusivement de mycelium et d'amas d'asques. Une pareille végétation se produit aussi par ensemencement dans une solution de saccharose à 10 %, bien qu'ici elle soit de beaucoup moins développée. Par contre, si l'on veut obtenir une abondante végétation de conidies, sa meilleure production a lieu sur une épaisse couche de moût gélatinisé. Il se forme ici une couche irrégulière d'une végétation mycélienne avec de fortes dépressions; ordinairement, la partie centrale a une couleur verdâtre due à la formation de conidies, et cette partie est entourée d'une ceinture jaune. Souvent aussi, les appareils conidiens sont réunis en ceintures: c'est ce qu'on constate généralement par ex. quand l'ensemencement se fait sous forme d'une culture par dissémination sur du moût gélatinisé renfermé dans des boîtes Petri. On voit alors que, règle générale, le centre des végétations est jaune; puis vient une bande gris verdâtre formée par les appareils conidiens et entourée, à son tour, d'une ceinture de mycelium jaune. La couleur jaune passe souvent à une

¹⁾ Voir la fig. 4 de mon mémoire précité sur le *Gymnoascus flavus*.

Chez cette espèce, la formation de conidies rappelle la production anormale de conidies qu'on peut rencontrer assez souvent chez certains types de *Penicillium*. Il n'est pas invraisemblable que le *G. flavus* ait eu originairement une végétation typique de conidies (en sorte qu'il aurait été ce que nous appelons *Penicillium*), et qu'il l'ait perdu avec le temps. Par conséquent, tel qu'il est maintenant, il ne saurait être classé nulle part ailleurs que dans le genre *Gymnoascus*.

teinte rougeâtre atteignant l'orangée. Si, pour l'ensemencement d'une pareille culture par dissémination, l'on prend des éléments copieux, de façon que les taches se soudent bientôt en croissant, la masse mycélienne tout entière garde ordinairement sa couleur jaune ou orangée, parce qu'alors la production de conidies est très peu abondante. Sous ce rapport, les variétés examinées par moi

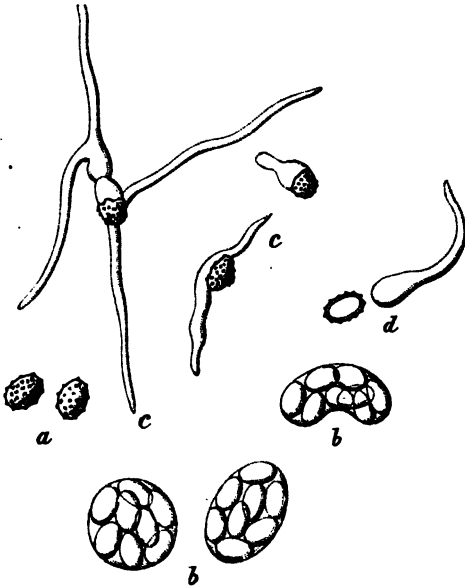


Fig. 1. *Penicillium Wortmanni*, nova species.
a, ascospores. b, asques renfermant de jeunes ascospores. c, d, ascospores en germination. c montre une partie de l'exosporium laquelle, après la germination, entoure l'endosporium. d, l'exosporium entier détaché. Env. $1000/\mu$.

se comportent différemment; car, dans les conditions en question, quelques-unes d'elles produisent très facilement des conidies, et alors la végétation entière prend une couleur gris verdâtre. En général, la couleur est très variable. — Sur moût gélatinisé, surtout en couche mince, il y a souvent aussi formation d'asques.

Du reste, pour caractériser l'espèce qui m'occupe, je peux ajouter ceci:

Le mycelium, d'abord blanc, prend bientôt une couleur jaune-soufre, qui parfois passe ensuite à l'orangé. La surface des filaments

mycéliens est souvent munie de grains jaunes, dont la matière colorante est facilement soluble dans l'alcool.

Les appareils conidiens varient de grandeur selon les milieux nourriciers; les stérigmes sont ordinairement longs de 9 à 13 μ .

Les conidies sont ovoïdes ou rondes, le plus fréquemment longues d'env. 2 μ ; mais on en rencontre aussi beaucoup de plus grandes, gonflées. L'entière masse conidienne est de couleur gris verdâtre, plus tard d'un beau gris clair.

Elles germent après gonflement, en émettant un ou plusieurs tubes germinatifs.

Les amas d'asques sont jaunes ou rougeâtres et entourés d'un tissu d'hyphe peu cohérentes.

Les asques sont ronds, ovoïdes ou, plus rarement, réniformes (fig. 1 b); parfois, leur forme est très irrégulière. Leur plus long diamètre est de 8 à 13 μ (le plus fréquemment de 10 μ env.). Ils renferment 8 ascospores ovoïdes, longues d'env. 4,6 μ sur env. 2,6 μ de largeur. La surface des spores présente de petites verrues plus ou moins distinctes (fig. 1, a). Les ascospores sont souvent teintées en jaune par une substance colorante soluble dans l'alcool.

Les ascospores (en tout cas les anciennes) affectent ce mode de germination que l'exosporium éclate et que l'endosporium, avec son contenu, développe un ou plusieurs tubes germinatifs. On voit souvent, après germination, l'exosporium éclaté entourer partiellement l'endosporium (fig. 1, c). C'est seulement par exception que l'exosporium tout entier se renverse et reste aux côtés de la spore germée; alors on n'y voit aucune ouverture (fig. 1, d), de même que je l'ai aussi observé dans la germination des spores chez le *Gymnoascus flavus* (voir l'endroit cité); d'après Wehmer, il en est toujours ainsi du *P. luteum*.

En croissant sur moût gélatinisé, le *Penicillium Wortmanni* liquéfie ce milieu.

Le nouveau *Penicillium* se rapproche à plusieurs égards du *P. luteum*. Il s'en distingue d'abord par ses ascospores, dont la surface est pleine de verrues, tandis que chez le *P. luteum* elles sont munies de 3 ou 4 filets transversaux. De plus, les végétations du *P. Wortmanni* sur une épaisse couche de moût gélatinisé affectent des formes très irrégulières, et sont fortement plissées, surtout fortement déprimées au centre, tandis que chez le *P. luteum* elles sont circulaires et présentent une surface tout à fait égale, sur laquelle il apparaît bientôt des gouttes brunes de moût gélatinisé liquide, phénomène que j'ai constamment observé chez cette espèce, mais jamais chez le *P. Wortmanni*. En ensemençant cette dernière espèce sur une mince couche de moût de bière étendu, renfermée dans des flacons Freudenreich, il se produit une végétation jaune de mycelium et d'asques; par contre, le *P. luteum* ne donne pas

d'asques dans ces conditions, mais des végétations de conidies vertes çà et là dans le mycelium jaune.

Il ressort donc de ce qui précède que le *P. Wortmanni*¹⁾ est une espèce bien définie et qui présente un certain intérêt non seulement en raison de son extraordinaire aptitude à donner des ascospores, mais encore par le service qu'il rend en mettant à même d'assigner aux espèces classées jusqu'ici sous le nom générique de *Penicillium*, les places qu'elles doivent occuper dans le système.

Août 1903.

¹⁾ Notre laboratoire a fourni une culture de cette espèce à celui de M. Král de Prague.

NOUVEAU GENRE DE LA FAMILLE DES SACCHAROMYCÈTES.

PAR

H. SCHIÖNNING

DURANT le printemps de 1902, M. le professeur E. Chr. Hansen, ayant pris un échantillon de terre à un talus gazonné entre le Hospenthal et le défilé du Saint-Gothard, l'envoya à notre laboratoire de Carlsberg pour le faire analyser. J'y trouvai une levure nouvelle, où des recherches plus amples firent constater des caractères qui l'excluent du genre *Saccharomyces*, mais lui font reconnaître le titre de représentant d'un nouveau genre en dedans de la famille des *Saccharomycètes*. Ce nouveau genre a reçu de moi la dénomination de *Saccharomycopsis*, et à la nouvelle espèce décrite plus loin, j'ai donné le nom de *Saccharomycopsis capsularis*. Je reviendrai plus tard sur ce point pour mieux motiver le choix de cette dénomination.

En analysant le susdit échantillon de terre, on a fait une culture par dissémination dans du moût gélatinisé, afin de mieux séparer les uns des autres les différents organismes présents. Parmi les colonies qui se développèrent, quelques-unes se sont attiré l'attention par leur singulière apparence; car celles qui dépassaient la surface de la gélatine, avaient l'air légèrement velues. Le microscope révéla dans cette colonie un mélange de mycelium et de cellules de levure. On prit pour point de départ une de ces colonies pour cultiver par cellule unique en chambre humide sur moût gélatinisé d'après la méthode de culture pure indiquée par Hansen. En transportant sur du moût de bière cette culture pure, on vit bientôt ce moût fermenter, et la végétation de levure de dépôt qui venait de se former ainsi, servit à une culture ordinaire sur bloc de plâtre, d'où l'on eut quelques spores. L'ensemble de sa manière caractéristique

de croître sur moût et la structure non moins remarquable de ses spores, me rendirent aussitôt évident que j'avais trouvé là un champignon de levure digne d'attention et jusqu'ici inobservé : j'en poursuivis donc l'étude plus minutieuse, et ce qui suit mentionnera le résultat de ces recherches.

Concurremment à la culture pure susdite tirée d'une seule cellule végétative, j'employai une culture provenant d'une spore unique; les résultats furent les mêmes. Si l'on introduit une telle culture pure dans un matras avec du moût et l'expose à une température favorable, par exemple 25° C., elle se déve-

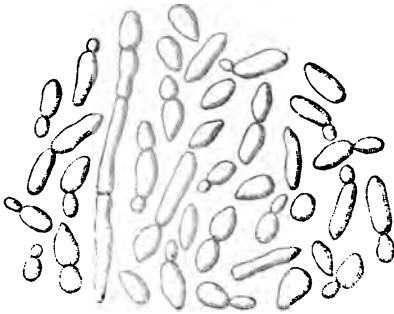


Fig. 1.

Végétation de levure de dépôt en moût de bière, au bout de 1 jour à une température de 25° C. 500/1.

loppe rapidement. En un jour il se forme un dépôt de levure dans le matras, et le moût entre peu à peu en fermentation. En examinant au microscope cette levure de dépôt, on la trouve composée d'une végétation de levure typique de cellules bourgeonnantes, qui diffèrent de formes et de grandeur. On en voit d'ellipsoïdes et d'ovoides; on voit aussi des cellules rappelant les *Saccharomyces Pastorianus*, et l'on

pourrait presque y voir une levure appartenant à ce groupe. Nombre d'entre elles sont un peu en pointe, soit en un bout, soit des deux, comme le montre fig. 1¹⁾. On trouve aussi, mais rarement, des cellules allongées et cloisonnées. Dans le cours de la deuxième journée, il commence à se former à la surface du moût de petits voiles formant îlots. L'examen microscopique de ce voile lui fait trouver un aspect tout autre qu'à la levure de dépôt; car elle se compose soit d'un mycelium typique à ramification et cloisons; soit d'un mycelium qui développe des bourgeons; ou encore d'un mycelium qui se scinde suivant les cloisons et s'arrondit en articles ronds ou bien analogues à l'*Oïdium*; ou enfin l'on voit de longues fils de cellules de levure bour-

¹⁾ Les figures ont été dessinées d'après des photographies faites au moyen de l'appareil microphotographique Zeiss du laboratoire de Carlsberg.

geonnantes. La levure de dépôt peut aussi au bout de 2 jours présenter quelques formations mycéliennes et de longues cellules avec des cloisons; du reste, son aspect au microscope est essentiellement le même qu'au bout du premier jour. Si le repos se prolonge, un voile se formera et couvrira toute la surface du moût, fréquemment étendu sur de grosses bulles d'écume qui rendent le voile fortement inégal. Si la culture est laissée com-

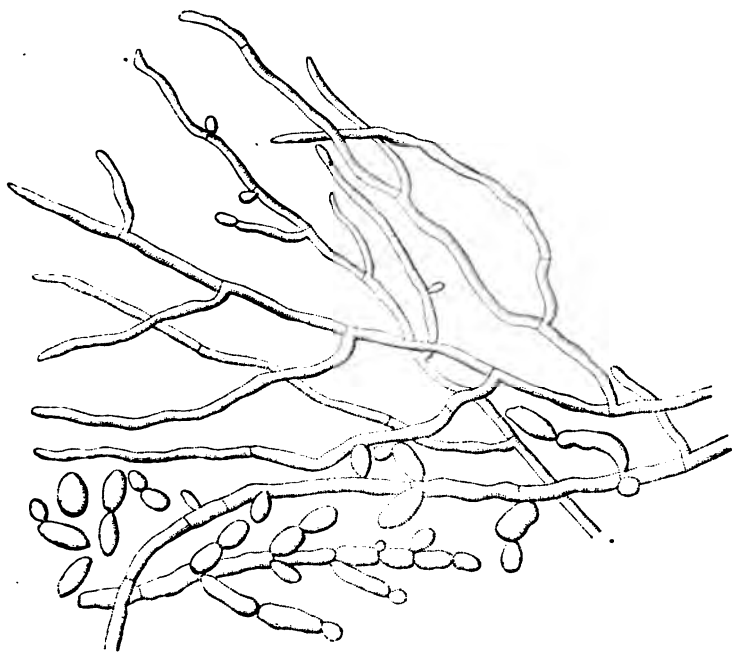


Fig. 2.

Végétation prise à un flot de voile en moût au bout de 2 jours, à 25 ° C. $\times 600/1$.

plètement en repos, cette formation superficielle épaissit souvent avec le temps et forme à la surface un tapis épais, très inégal, sec et blanc, légèrement velouté, composé d'un mélange de mycelium et de cellules de levure. Ce mycelium peut aussi développer des cellules de levure et, de plus, il y a beaucoup de filaments de mycelium qui par étranglement donnent des articles plus indépendants. C'est surtout dans les cultures en flacons Freudenreich que la formation superficielle au repos peut acquérir une très grande épaisseur; ainsi au bout d'un mois et à la température

ordinaire du laboratoire, une culture en moût de bière dans un tel flacon donna une couche épaisse de 20 mm. Si le repos se prolonge encore, cette végétation superficielle donne quelques spores. On dira plus tard comment se forment ces spores.

Si l'on infecte de l'eau de levure ordinaire dans un flacon Freudenreich avec un peu d'un voile formé sur du moût et qu'une fois ou deux on rafraîchisse à l'aide du même liquide nutritif la végétation qui s'est développée, on constatera au bout d'un jour d'abandon à 25° C. l'évolution de colonies microscopiques de mycelium. Le microscope les présentera comme un ample développement de mycelium typique, ramifié, et cloisonné. Nombre des filaments donnent par étranglement, bien que généralement en petit nombre, des cellules de levure. Au bout de 2 jours, on voit, à la surface, des voiles en îlots blancs et velus, composés de mycelium, où quelques-uns des filaments détachent des cellules de levure par étranglement. Si le repos dure 3 ou 4 jours, la surface entière se couvrira d'une formation assez forte et cohérente de mycelium, qui flotte à la surface du liquide et la hérise d'îlots secs, blancs et inégaux, ayant un aspect légèrement velouté. Une végétation de surface préparée pour le microscope s'y est montrée comme mycelium typique fortement développé et à nombreuses cloisons. En pareil cas on constate également que surtout les bouts des filaments se scindent en cellules, qui s'arrondissent de manière à assumer la forme sphérique ou d'Oidium. Ces cellules résultent soit d'étranglement, soit de scission, soit des deux; on en voit aussi qui naissent d'un simple bourgeonnement. En même temps que ces cellules se forment, elles se gonflent. Elles ont l'air très vigoureuses et sont pleines d'un plasma granulé fortement réfringent. Les filaments mycéliens, eux aussi, font voir des articles plus ou moins gonflés et remplis du même plasma très réfringent. Ajouté à la préparation, un peu d'une solution étendue d'iodure de potassium iodé, teint ces cellules plasmatiques plus fortement que le reste du mycelium et que les cellules ordinaires de levure, donnant aux premières une couleur jaune grisâtre marquée, tandis que le reste de la végétation n'est pour ainsi dire pas coloré. Un repos plus prolongé fait produire des spores à ces cellules plasmatiques, et plus on approche de cette phase qui donne les spores, plus leur coloration par l'addition d'iode sera intense. Lorsque la culture a reposé quelque 5 jours à

25° C. L'analyse y montre beaucoup de spores et on ne de donner des spores et les autres choses sont assez et dans les journées suivantes avec l'augmentation de spores augmente beaucoup et avec nous autres en augmentant de beaucoup. La spore, elle aussi, est tenue en main par une des phases de l'entraînement et à mesure de l'augmentation de spores iode en élève sans autres choses la croissance et l'âge



Fig. 3.

Végétations de spores. a, d'une culture sur eau de levure; b, d'une culture sur eau de levure gélatinisée et additionnée d'agar; c, d'une culture sur eau de levure. Ici, une spore germée a formé, en croissant, un filament mycélien, dans l'article terminal duquel de nouvelles spores viennent de se produire. 500/1.

brun qui caractérise le glycogène. Ce n'est pas simplement dans les cellules de la surface que se forment les spores; on les retrouve aussi, mais naturellement en moindre abondance, dans le liquide nutritif même. On trouve presque constamment 4 spores en chaque asque. De temps à autre, on peut y en trouver un nombre moindre; mais en beaucoup de ces cas on verra que les spores en apparence manquantes sont présentes à l'état rudimentaire. Je n'en ai jamais compté plus de quatre dans un asque. En général, la formation des spores commence dans les cellules les plus rapprochées de l'extrémité libre du filament, et même très souvent dans la plus extérieure, pour avancer de plus en plus vers le centre. On peut même rencontrer

des articles munis de spores jusqu'au coeur de la masse mycélienne. Les parois de la cellule mère s'effacent assez rapidement, laissant les spores libres; le plus souvent elles restent groupées quatre à quatre.

Si dans une goutte d'acide sulfurique un peu fort l'on introduit un peu de cette abondante végétation de spores, la presque totalité du mycelium et des cellules de levure s'y dissolvent, surtout si l'acide est concentré, et il ne reste que les spores. Elles ont subi une légère diminution de volume; mais leur forme souffre remarquablement peu de ce traitement; c'est l'inverse de ce que j'ai obtenu d'autres champignons de levure et, chose à remarquer, la petite masse de spores en contact avec l'acide sulfurique prend une belle couleur rose bien accentuée. Ce ton ressort d'autant mieux que l'acide est plus fort. En ajoutant à une culture à spores sur eau de levure renfermée dans un flacon Freudenreich un peu d'acide sulfurique concentré, soit par ex. $\frac{1}{6}$ du volume de cette eau, nous obtiendrons, en secouant, un fort dégagement d'air, qui soulèvera les parties de végétation non dissoutes par l'acide sulfurique, c'est-à-dire les spores; celles-ci, arrivées à la surface, y resteront en petits grumeaux roses, et regagneront le fond dès que le dégagement d'air cessera. Ce dépôt rouge garde longtemps sa couleur sans altération; on l'a même constatée six mois après. Le lavage à l'eau d'un grumeau de spores coloré par l'acide sulfurique, fait disparaître la couleur; mais celle-ci revient par le traitement à l'acide. La réaction est aussi franche dans les cultures anciennes (1 an) à spores que dans les nouvelles. Elle est de toute beauté surtout quand on prend une culture à spores sur eau de levure gélatinisée et principalement sur ce substratum additionné d'agar, ces milieux favorisant beaucoup la croissance de ce champignon; il donne alors surabondance de spores. En faisant la culture, dans un flacon Freudenreich, par raies sur une couche inclinée de l'un des milieux susdits, et versant sur la végétation qui se produit ici un peu d'acide sulfurique concentré, elle prend une magnifique couleur rose qui tire un peu sur le bleu. En général, toutes les cultures riches en spores donnent cette réaction chromatique; telles aussi les cultures sur pain ou riz. En regardant au microscope les spores traitées par l'acide, on verra que dans celles qui restent isolées dans la préparation la teinte s'est seulement foncée, tandis que dans les endroits

ou les spores se sont agglomérées à peine rouge et mamelonnée. On a la même réaction obtenue que ci-dessus par les acides nitrique, chlorhydrique et fluorhydrique concentrés.

La grande résistance dont les spores font preuve en face des acides concentrés, est certainement unique parmi les champignons de levure. Beaucoup de cultures riches en spores et appartenant à diverses espèces de *Saccharomyces* typiques ainsi qu'au *Schizosaccharomyces octosporus*, ont été essayées avec de l'acide sulfurique concentré, dans un but de comparaison, mais aucune n'échappe à ce résultat que soit la cellule végétative soit la spore ont été fortement attaquées ou même entièrement dissoutes par le traitement à l'acide. Ici il n'est pas question de coloration en rouge¹.

Si, choisissant une culture riche en spores, par ex. sur eau de levure, on en fait une préparation ordinaire à l'eau, et qu'on arrête spécialement son attention sur les spores détachées, isolées, dont la plupart apparaissent rondes, tandis que l'aspect des autres tend plus à la forme ovale, un examen plus approfondi de ces dernières révélera en beaucoup d'entre elles une ligne transversale fine qui partage la spore ovale en deux parties généralement inégales; on ne voit rien de tel sur les spores rondes. L'addition d'un peu d'iode de potassium iodé en dilution, rend cette ligne un peu plus manifeste. En refaisant cette opération, mais avec une goutte de liquide plus grosse pour y permettre une circulation facile des spores ainsi mises en mouvement, on constate cette ligne sur toutes les spores vues de profil, ligne fine qui paraît claire ou sombre suivant la mise au point, et qui fait le tour de la spore. C'est par exception qu'elle en occupe le milieu: en général, elle divise la spore en un gros

¹) Outre les levures susmentionnées, on a également examiné l'influence de l'acide sulfurique concentré sur diverses moisissures, telles des végétations des *Penicillium Wortmanni*, *Gymnoascus flavus*, *Anixiopsis stercoraria*, *Aspergillus glaucus* et *Sterigmatocystis nidulans*. Toutes ces végétations prenaient une abondante fructification par asques. Les végétations des deux premières espèces furent entièrement dissoutes par l'acide, tandis que pour les trois dernières les ascospores échappaient à son action dissolvante. D'autre part, tandis que chez l'*Anixiopsis stercoraria* et l'*Aspergillus glaucus* ces organes sont demeurés incolores, chez le *Sterigmatocystis nidulans* ils ont pris une couleur violette tirant sur le bleu, ce qui constitue donc une nouvelle réaction chromatique.

segment et un petit, et si, dans la première préparation, cette ligne n'est pas visible sur la plupart des spores — surtout celles qui paraissent rondes —, la raison en est simplement que d'ordinaire la spore cherche à occuper dans la préparation une position telle que le plan de cette ligne annulaire soit horizontal, ce qui la fait coïncider avec le contour de la spore, cette dernière ayant une partie plus lourde. Vue de dessus, l'ascospore paraît donc circulaire, et son profil est plutôt oval, comme celui d'une boule un peu aplatie.

Or, que signifie cette ligne annulaire? Pour résoudre cette question, l'on a commencé par essayer de faire germer la spore, chose facile si l'on sème en moût de bière des spores mûres dans une chambre Ranvier. Si armé d'un microscope on surveille la germination dans cette chambre à la température du laboratoire, surtout en notant les spores dont le profil montre la transversale mentionnée, on verra dès la 4^e ou 6^e heure écoulée, les spores qui commencent à gonfler, la membrane se rompant alors suivant cette ligne. La

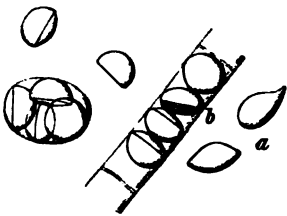


Fig. 4.
Spores. a, formes irrégulières.
1000/1.

spore est à double paroi et par conséquent munie d'un exosporium et d'un endosporium. L'exosporium se compose de deux valvules généralement inégales, qui s'appliquent l'une contre l'autre suivant une suture, qui le plus souvent a l'aspect d'une ligne fine, bien qu'en certains cas elle puisse aussi affecter la forme d'une nervure faisant le tour de la spore. En d'autres cas, la seule distinction des deux valvules de l'exosporium est que sous un certain jour la spore présente une moitié sombre et l'autre claire (fig. 4 b). La germination déchire l'exosporium de la spore suivant la suture. Ordinairement les deux valvules restent unies en un point, imitant les deux valves d'une coquille de moule, autour de la cellule gonflée. Peu après, l'on aperçoit sur celle-ci un petit bourgeon qui se forme et en quelques heures atteint des dimensions et pousse lui-même de nouveaux bourgeons; la spore elle-même peut aussi en émettre plusieurs. Si l'on suit ainsi la germination des spores dans la préparation au moût, on verra qu'elle procède par bourgeonnement

ordinaire, comme le montre la fig. 3. L'exospermium reste longtemps fixe sur la spore bourgeonnante.

Mûres et complètement développées, les spores sont pleines d'un plasma homogène, fortement réfringent, où l'on voit habituellement un ou plusieurs grains encore plus réfringents. De grandeur très variable, elles peuvent avoir un diamètre maximum d'environ $5 \text{ à } 6,2 \mu$; mais d'ailleurs on peut trouver des spores d'un diamètre entre $3,2$ et 8μ . L'ensemble de la forme est assez régulier: mais de

temps à autre on peut rencontrer des spores d'aspect un peu irrégulier, comme on le voit en fig. 4, a. Les types reproduits ici peuvent se rencontrer dans toutes les cultures; mais c'est sur-



Fig. 5.

Spore en germination en chambre Ranvier avec du moût de bière, à la température ordinaire du laboratoire. a'' au bout de 2, a''' au bout de 4, a'''' au bout de 9 heures.
1000/ μ .

tout dans les cultures sur blocs de plâtre qu'on les a trouvés fréquemment. Un traitement spécial fait constater que chez quelques-unes la suture occupe le bord du côté plat, tandis que dans d'autres, même après due préparation, cette suture est invisible, bien qu'on ne puisse pas douter qu'elle existe réellement. En somme, il n'est pas toujours aisé de voir cette formation, surtout tant que la spore est encore dans l'asque. Pour bien l'étudier, ce qu'il y a de mieux à faire est de partir d'une culture sur un substratum contenant de l'eau de levure. Dans les cas où la suture des spores s'aperçoit nettement pendant qu'elles sont encore dans leurs asques, on a constaté que la position de telle ou telle spore par rapport aux autres dans la cellule mère est assez fortuite et dépend en partie de la forme de cette dernière.

La structure de la spore peut aussi être observée d'une manière autre que celle ci-dessus indiquée. Ainsi, en faisant une préparation de culture à spores dans une goutte d'acide sulfurique concentré, l'observateur au microscope distinguera très nettement la suture, surtout s'il coude son instrument horizontalement. La préparation sera le théâtre d'une certaine circulation, qui fera voir telle spore de différents côtés et, comme le

plan de la suture de la spore se place volontiers horizontalement, on y gagne précisément une chance de bien voir de profil cette formation. En baissant avec précaution le tube du microscope de manière à l'appuyer légèrement contre le couvre-objet, on peut obtenir que dans la préparation en question l'exosporium de la spore se partage suivant la suture. Les deux valvules de cet exosporium se placent alors comme les deux valves d'une coquille de moule se tenant par la charnière, ou séparées l'une de l'autre si la pression a été trop forte. On n'a rien constaté dans la cellule; son contenu a dû être dissous par l'acide. En traitant par l'acide sulfurique, on notera également que l'une des valvules de l'exosporium, la plus grande, est aussi la plus épaisse. Le maximum d'épaisseur ainsi constaté dans la paroi de l'exosporium, a été d'environ $1\ \mu$. Si une spore n'a pas été traitée par le susdit acide, on ne peut pas la faire éclore par pression suivant la suture. Soumise à cette pression, elle se délayera simplement, sans aucune séparation en exosporium et endosporium.

C'est donc l'exosporium que le traitement par l'acide sulfurique teint en rouge. Je n'ai découvert nulle part de mention relative à cette réaction sur les spores de champignons; en tout cas, jamais encore on ne l'a observée chez les champignons de levures. Par contre, on l'a observée chez beaucoup de spores d'autres plantes et de grains de pollen¹⁾. La réaction colorante est attribuée à ce que ces organes seraient pourvus d'une membrane cutinisée, insoluble dans l'acide concentré, et ce serait ainsi cette membrane que l'acide colorerait en rouge.

Ce qui précède permet d'admettre que dans mon espèce de levure l'exosporium des spores contient une substance subérisée. Nombre d'autres réactions viennent encore corroborer cette hypothèse. Ainsi les spores sont colorées en brun jaunâtre par l'iode joint à l'acide sulfurique étendu et de même par le chlorure de zinc iodé; dans l'acide chromique concentré elles ne se dissolvent qu'après y avoir séjourné quelque temps, et elles sont insolubles dans un liquide cupro-ammoniacal; quand on les chauffe dans une forte lessive de potasse, on a une réaction qui colore fortement en jaune.

¹⁾ J. Sachs, Lehrbuch der Botanik, 1873, p. 35 et 36.

W. Behrens, Hilfsbuch zur Ausführung mikroskopischer Untersuchungen im botanischen Laboratorium, 1883, p. 297.

La présence de cette membrane cutinisée met la spore en état de bien résister à l'influence des agents extérieurs, tels que l'humidité, la dessiccation, la putréfaction, etc.

Les expériences faites en chambre humide sur la germination des spores méritent une plus ample mention. Ainsi, en semant sur moût de bière dans une chambre Ranvier quelques spores, qu'il vaut mieux tenir séparées, tout au plus en groupes

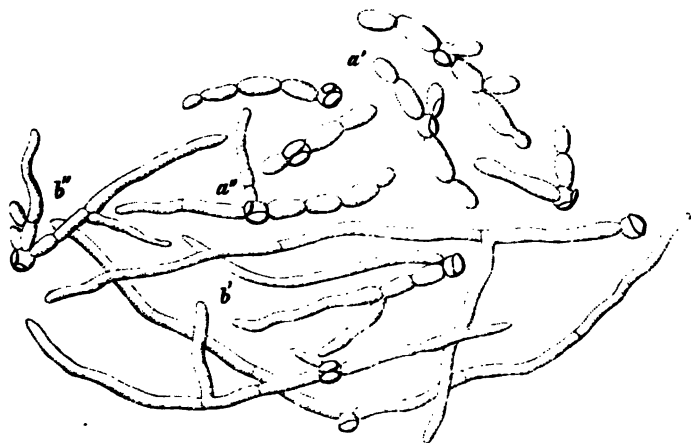


Fig. 6.

Des spores en germination. a' au bout de 24 heures, a'' au bout de 42 heures sur moût; b' au bout de 24 heures, b'' au bout de 42 heures sur eau de levure. Température ordinaire du laboratoire. ⁵⁰⁰/₁.

de quatre, et maintenant la chambre à la température du laboratoire, on verra qu'en 4 ou 6 heures la plupart des spores débiteront par germer, par voie de gonflement et éclatant l'exosporium en deux parties, puis pousseront des bourgeons. Durant les heures suivantes, ce bourgeonnement se poursuit très activement (fig. 6, a'). Toutefois, on notera que pendant la deuxième journée, si les cellules de levure continuent à croître, c'est par ce que chaque cellule à part elle s'étend de plus en plus en longueur, c'est-à-dire assume la forme de filament mycélien et se cloisonne; en d'autres termes, la tendance devient alors de former un mycelium, et les spores qui alors seulement commencent à germer, vont le faire de cette même manière; elles pousseront d'abord un petit bourgeon, qui va s'al-

ordinaire du laboratoire, une culture en moût de bière dans un tel flacon donna une couche épaisse de 20 mm. Si le repos se prolonge encore, cette végétation superficielle donne quelques spores. On dira plus tard comment se forment ces spores.

Si l'on infecte de l'eau de levure ordinaire dans un flacon Freudenreich avec un peu d'un voile formé sur du moût et qu'une fois ou deux on rafraîchisse à l'aide du même liquide nutritif la végétation qui s'est développée, on constatera au bout d'un jour d'abandon à 25° C. l'évolution de colonies microscopiques de mycelium. Le microscope les présentera comme un ample développement de mycelium typique, ramifié, et cloisonné. Nombre des filaments donnent par étranglement, bien que généralement en petit nombre, des cellules de levure. Au bout de 2 jours, on voit, à la surface, des voiles en îlots blancs et velus, composés de mycelium, où quelques-uns des filaments détachent des cellules de levure par étranglement. Si le repos dure 3 ou 4 jours, la surface entière se couvrira d'une formation assez forte et cohérente de mycelium, qui flotte à la surface du liquide et la hérisse d'îlots secs, blancs et inégaux, ayant un aspect légèrement velouté. Une végétation de surface préparée pour le microscope s'y est montrée comme mycelium typique fortement développé et à nombreuses cloisons. En pareil cas on constate également que surtout les bouts des filaments se scindent en cellules, qui s'arrondissent de manière à assumer la forme sphérique ou d'Oidium. Ces cellules résultent soit d'étranglement, soit de scission, soit des deux; on en voit aussi qui naissent d'un simple bourgeonnement. En même temps que ces cellules se forment, elles se gonflent. Elles ont l'air très vigoureuses et sont pleines d'un plasma granulé fortement réfringent. Les filaments mycéliens, eux aussi, font voir des articles plus ou moins gonflés et remplis du même plasma très réfringent. Ajouté à la préparation, un peu d'une solution étendue d'iodure de potassium iodé, teint ces cellules plasmatiques plus fortement que le reste du mycelium et que les cellules ordinaires de levure, donnant aux premières une couleur jaune grisâtre marquée, tandis que le reste de la végétation n'est pour ainsi dire pas coloré. Un repos plus prolongé fait produire des spores à ces cellules plasmatiques, et plus on approche de cette phase qui donne les spores, plus leur coloration par l'addition d'iode sera intense. Lorsque la culture a reposé quelque 5 jours à

25 ° C., l'analyse y montre beaucoup desdites cellules en voie de donner des spores ou les ayant toutes développées, et durant les journées suivantes cette formation de spores augmentera beaucoup, et alors nous aurons un abondant développement. La spore, elle aussi, est teinte en jaune par l'iode. Aux diverses phases de l'évolution, on a ajouté de l'iodure de potassium iodé en dilution sans jamais observer la coloration en rouge

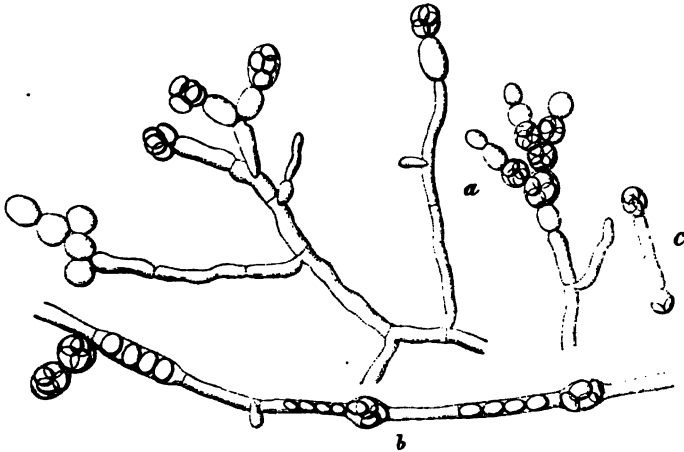


Fig. 3.

Végétations de spores. a, d'une culture sur eau de levure; b, d'une culture sur eau de levure gélatinisée et additionnée d'agar; c, d'une culture sur eau de levure. Ici, une spore germée a formé, en croissant, un filament mycélien, dans l'article terminal duquel de nouvelles spores viennent de se produire. ⁵⁰⁰/₁.

brun qui caractérise le glycogène. Ce n'est pas simplement dans les cellules de la surface que se forment les spores; on les retrouve aussi, mais naturellement en moindre abondance, dans le liquide nutritif même. On trouve presque constamment 4 spores en chaque asque. De temps à autre, on peut y en trouver un nombre moindre; mais en beaucoup de ces cas on verra que les spores en apparence manquantes sont présentes à l'état rudimentaire. Je n'en ai jamais compté plus de quatre dans un asque. En général, la formation des spores commence dans les cellules les plus rapprochées de l'extrémité libre du filament, et même très souvent dans la plus extérieure, pour avancer de plus en plus vers le centre. On peut même rencontrer

des articles munis de spores jusqu'au coeur de la masse mycélienne. Les parois de la cellule mère s'effacent assez rapidement, laissant les spores libres; le plus souvent elles restent groupées quatre à quatre.

Si dans une goutte d'acide sulfurique un peu fort l'on introduit un peu de cette abondante végétation de spores, la presque totalité du mycelium et des cellules de levure s'y dissolvent, surtout si l'acide est concentré, et il ne reste que les spores. Elles ont subi une légère diminution de volume; mais leur forme souffre remarquablement peu de ce traitement; c'est l'inverse de ce que j'ai obtenu d'autres champignons de levure et, chose à remarquer, la petite masse de spores en contact avec l'acide sulfurique prend une belle couleur rose bien accentuée. Ce ton ressort d'autant mieux que l'acide est plus fort. En ajoutant à une culture à spores sur eau de levure renfermée dans un flacon Freudenreich un peu d'acide sulfurique concentré, soit par ex. $\frac{1}{8}$ du volume de cette eau, nous obtiendrons, en secouant, un fort dégagement d'air, qui soulèvera les parties de végétation non dissoutes par l'acide sulfurique, c'est-à-dire les spores; celles-ci, arrivées à la surface, y resteront en petits grumeaux roses, et regagneront le fond dès que le dégagement d'air cessera. Ce dépôt rouge garde longtemps sa couleur sans altération; on l'a même constatée six mois après. Le lavage à l'eau d'un grumeau de spores coloré par l'acide sulfurique, fait disparaître la couleur; mais celle-ci revient par le traitement à l'acide. La réaction est aussi franche dans les cultures anciennes (1 an) à spores que dans les nouvelles. Elle est de toute beauté surtout quand on prend une culture à spores sur eau de levure gélatinisée et principalement sur ce substratum additionné d'agar, ces milieux favorisant beaucoup la croissance de ce champignon; il donne alors surabondance de spores. En faisant la culture, dans un flacon Freudenreich, par raies sur une couche inclinée de l'un des milieux susdits, et versant sur la végétation qui se produit ici un peu d'acide sulfurique concentré, elle prend une magnifique couleur rose qui tire un peu sur le bleu. En général, toutes les cultures riches en spores donnent cette réaction chromatique; telles aussi les cultures sur pain ou riz. En regardant au microscope les spores traitées par l'acide, on verra que dans celles qui restent isolées dans la préparation la teinte s'est seulement foncée, tandis que dans les endroits

ou les spores se sont agglomérées la teinte rouge est manifeste. On a la même réaction colorée que ci-dessus par les acides nitrique, chlorhydrique et fluorhydrique concentrés.

La grande résistance dont les spores font preuve en face des acides concentrés, est certainement unique parmi les champignons de levure. Beaucoup de cultures riches en spores et appartenant à diverses espèces de *Saccharomyces* typiques ainsi qu'au *Schizosaccharomyces octosporus*, ont été essayées avec de l'acide sulfurique concentré, dans un but de comparaison, mais aucune n'échappe à ce résultat que soit la cellule végétative soit la spore ont été fortement attaquées ou même entièrement dissoutes par le traitement à l'acide. Ici il n'est pas question de coloration en rouge.

Si, choisissant une culture riche en spores, par ex. sur eau de levure, on en fait une préparation ordinaire à l'eau, et qu'on arrête spécialement son attention sur les spores détachées, isolées, dont la plupart apparaissent rondes, tandis que l'aspect des autres tend plus à la forme ovale, un examen plus approfondi de ces dernières révélera en beaucoup d'entre elles une ligne transversale fine qui partage la spore ovale en deux parties généralement inégales; on ne voit rien de tel sur les spores rondes. L'addition d'un peu d'iodure de potassium iodé en dilution, rend cette ligne un peu plus manifeste. En refaisant cette opération, mais avec une goutte de liquide plus grosse pour y permettre une circulation facile des spores ainsi mises en mouvement, on constate cette ligne sur toutes les spores vues de profil, ligne fine qui paraît claire ou sombre suivant la mise au point, et qui fait le tour de la spore. C'est par exception qu'elle en occupe le milieu: en général, elle divise la spore en un gros

¹⁾ Outre les levures susmentionnées, on a également examiné l'influence de l'acide sulfurique concentré sur diverses moisissures, telles des végétations des *Penicillium Wortmanni*, *Gymnoascus flavus*, *Anixiopsis stercoraria*, *Aspergillus glaucus* et *Sterigmatocystis nidulans*. Toutes ces végétations présentaient une abondante fructification par askes. Les végétations des deux premières espèces furent entièrement dissoutes par l'acide, tandis que pour les trois dernières les ascospores échappaient à son action dissolvante. D'autre part, tandis que chez l'*Anixiopsis stercoraria* et l'*Aspergillus glaucus* ces organes sont demeurés incolores, chez le *Sterigmatocystis nidulans* ils ont pris une couleur violette tirant sur le bleu, ce qui constitue donc une nouvelle réaction chromatique.

segment et un petit, et si, dans la première préparation, cette ligne n'est pas visible sur la plupart des spores — surtout celles qui paraissent rondes —, la raison en est simplement que d'ordinaire la spore cherche à occuper dans la préparation une position telle que le plan de cette ligne annulaire soit horizontal, ce qui la fait coïncider avec le contour de la spore, cette dernière ayant une partie plus lourde. Vue de dessus, l'ascospore paraît donc circulaire, et son profil est plutôt oval, comme celui d'une boule un peu aplatie.

Or, que signifie cette ligne annulaire? Pour résoudre cette question, l'on a commencé par essayer de faire germer la spore, chose facile si l'on sème en moût de bière des spores mûres dans une chambre Ranvier. Si armé d'un microscope on surveille la germination dans cette chambre à la température du laboratoire, surtout en notant les spores dont le profil montre la transversale mentionnée, on verra dès la 4^e ou 6^e heure écoulée, les spores qui commencent à gonfler, la membrane se rompant alors suivant cette ligne. La

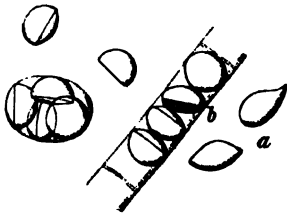


Fig. 4.
Spores. a, formes irrégulières.
1000/₁.

spore est à double paroi et par conséquent munie d'un exosporium et d'un endosporium. L'exosporium se compose de deux valvules généralement inégales, qui s'appliquent l'une contre l'autre suivant une suture, qui le plus souvent a l'aspect d'une ligne fine, bien qu'en certains cas elle puisse aussi affecter la forme d'une nervure faisant le tour de la spore. En d'autres cas, la seule distinction des deux valvules de l'exosporium est que sous un certain jour la spore présente une moitié sombre et l'autre claire (fig. 4 b). La germination déchire l'exosporium de la spore suivant la suture. Ordinairement les deux valvules restent unies en un point, imitant les deux valves d'une coquille de moule, autour de la cellule gonflée. Peu après, l'on aperçoit sur celle-ci un petit bourgeon qui se forme et en quelques heures atteint des dimensions et pousse lui-même de nouveaux bourgeons; la spore elle-même peut aussi en émettre plusieurs. Si l'on suit ainsi la germination des spores dans la préparation au moût, on verra qu'elle procède par bourgeonnement

ordinaire, comme le montre la fig. 5. L'exosporium reste longtemps fixé sur la spore bourgeonnante.

Mûres et complètement développées, les spores sont pleines d'un plasma homogène, fortement réfringent, où l'on voit habituellement un ou plusieurs grains encore plus réfringents. De grandeur très variable, elles peuvent avoir un diamètre maximum d'environ 5 à $6\frac{1}{2}$ μ ; mais d'ailleurs on peut trouver des spores d'un diamètre entre $3\frac{1}{2}$ et 8 μ . L'ensemble de la forme est assez régulier; mais de

temps à autre on peut rencontrer des spores d'aspect un peu irrégulier, comme on le voit en fig. 4, a. Les types reproduits ici peuvent se rencontrer dans toutes les cultures; mais c'est surtout dans les cultures sur blocs de plâtre qu'on les a trouvés fréquemment. Un traitement spécial fait constater que chez quelques-unes la suture occupe le

bord du côté plat, tandis que dans d'autres, même après due préparation, cette suture est invisible, bien qu'on ne puisse pas douter qu'elle existe réellement. En somme, il n'est pas toujours aisé de voir cette formation, surtout tant que la spore est encore dans l'asque. Pour bien l'étudier, ce qu'il y a de mieux à faire est de partir d'une culture sur un substratum contenant de l'eau de levure. Dans les cas où la suture des spores s'aperçoit nettement pendant qu'elles sont encore dans leurs asques, on a constaté que la position de telle ou telle spore par rapport aux autres dans la cellule mère est assez fortuite et dépend en partie de la forme de cette dernière.

La structure de la spore peut aussi être observée d'une manière autre que celle ci-dessus indiquée. Ainsi, en faisant une préparation de culture à spores dans une goutte d'acide sulfurique concentré, l'observateur au microscope distinguera très nettement la suture, surtout s'il coude son instrument horizontalement. La préparation sera le théâtre d'une certaine circulation, qui fera voir telle spore de différents côtés et, comme le



Fig. 5.

Spore en germination en chambre Ranvier avec du moût de bière, à la température ordinaire du laboratoire. a'' au bout de 2, a''' au bout de 4, a'''' au bout de 9 heures.
1000/1.

plan de la suture de la spore se place volontiers horizontalement, on y gagne précisément une chance de bien voir de profil cette formation. En baissant avec précaution le tube du microscope de manière à l'appuyer légèrement contre le couvre-objet, on peut obtenir que dans la préparation en question l'exosporium de la spore se partage suivant la suture. Les deux valvules de cet exosporium se placent alors comme les deux valves d'une coquille de moule se tenant par la charnière, ou séparées l'une de l'autre si la pression a été trop forte. On n'a rien constaté dans la cellule; son contenu a dû être dissous par l'acide. En traitant par l'acide sulfurique, on notera également que l'une des valvules de l'exosporium, la plus grande, est aussi la plus épaisse. Le maximum d'épaisseur ainsi constaté dans la paroi de l'exosporium, a été d'environ $1\ \mu$. Si une spore n'a pas été traitée par le susdit acide, on ne peut pas la faire éclore par pression suivant la suture. Soumise à cette pression, elle se délayera simplement, sans aucune séparation en exosporium et endosporium.

C'est donc l'exosporium que le traitement par l'acide sulfurique teint en rouge. Je n'ai découvert nulle part de mention relative à cette réaction sur les spores de champignons; en tout cas, jamais encore on ne l'a observée chez les champignons de levures. Par contre, on l'a observée chez beaucoup de spores d'autres plantes et de grains de pollen¹⁾. La réaction colorante est attribuée à ce que ces organes seraient pourvus d'une membrane cutinisée, insoluble dans l'acide concentré, et ce serait ainsi cette membrane que l'acide colorerait en rouge.

Ce qui précède permet d'admettre que dans mon espèce de levure l'exosporium des spores contient une substance subérisée. Nombre d'autres réactions viennent encore corroborer cette hypothèse. Ainsi les spores sont colorées en brun jaunâtre par l'iode joint à l'acide sulfurique étendu et de même par le chlorure de zinc iodé; dans l'acide chromique concentré elles ne se dissolvent qu'après y avoir séjourné quelque temps, et elles sont insolubles dans un liquide cupro-ammoniacal; quand on les chauffe dans une forte lessive de potasse, on a une réaction qui colore fortement en jaune.

¹⁾ J. Sachs, Lehrbuch der Botanik, 1873, p. 35 et 36.

W. Behrens, Hilfsbuch zur Ausführung mikroskopischer Untersuchungen im botanischen Laboratorium, 1883, p. 297.

La présence de cette membrane contribue avec la spore en état de bien résister à l'influence des agents extérieurs tels que l'humidité, la dessiccation, la pénombre, etc.

Les expériences faites en chambre humide sur la germination des spores montrent une plus ample mention. Ainsi, en semant sur moût de bière dans une chambre Ranvier quelques spores, qu'il vaut mieux tenir séparées, soit au plus en groupes

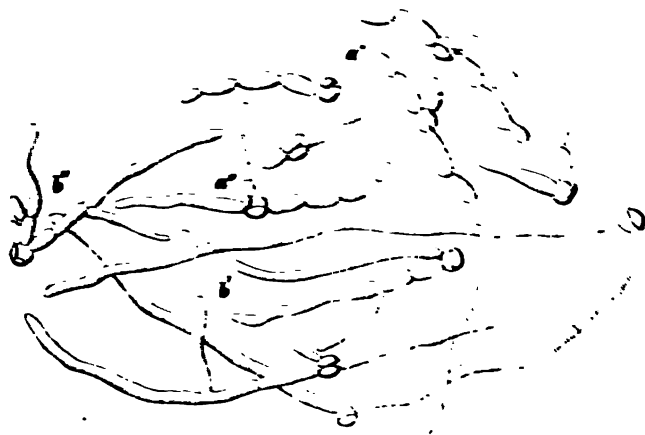


Fig. 6.

Des spores en germination. a' au bout de 24 heures, a'' au bout de 42 heures sur moût; b' au bout de 24 heures, b'' au bout de 42 heures sur eau de levure. Température ordinaire du laboratoire. ^{800/1}

de quatre, et maintenant la chambre à la température du laboratoire, on verra qu'en 4 ou 6 heures la plupart des spores débiteront par germer, par voie de gonflement et éclatant l'exosporium en deux parties, puis pousseront des bourgeons. Durant les heures suivantes, ce bourgeonnement se poursuit très activement (fig. 6, a'). Toutefois, on notera que pendant la deuxième journée, si les cellules de levure continuent à croître, c'est par ce que chaque cellule à part elle s'étend de plus en plus en longueur, c'est-à-dire assume la forme de filament mycélien et se cloisonne; en d'autres termes, la tendance devient alors de former un mycelium, et les spores qui alors seulement commencent à germer, vont le faire de cette même manière; elles pousseront d'abord un petit bourgeon, qui va s'al-

ordinaire du laboratoire, une culture en moût de bière dans un tel flacon donna une couche épaisse de 20 mm. Si le repos se prolonge encore, cette végétation superficielle donne quelques spores. On dira plus tard comment se forment ces spores.

Si l'on infecte de l'eau de levure ordinaire dans un flacon Freudenreich avec un peu d'un voile formé sur du moût et qu'une fois ou deux on rafraîchisse à l'aide du même liquide nutritif la végétation qui s'est développée, on constatera au bout d'un jour d'abandon à 25° C. l'évolution de colonies microscopiques de mycelium. Le microscope les présentera comme un ample développement de mycelium typique, ramifié, et cloisonné. Nombre des filaments donnent par étranglement, bien que généralement en petit nombre, des cellules de levure. Au bout de 2 jours, on voit, à la surface, des voiles en îlots blancs et velus, composés de mycelium, où quelques-uns des filaments détachent des cellules de levure par étranglement. Si le repos dure 3 ou 4 jours, la surface entière se couvrira d'une formation assez forte et cohérente de mycelium, qui flotte à la surface du liquide et la hérisse d'îlots secs, blancs et inégaux, ayant un aspect légèrement velouté. Une végétation de surface préparée pour le microscope s'y est montrée comme mycelium typique fortement développé et à nombreuses cloisons. En pareil cas on constate également que surtout les bouts des filaments se scindent en cellules, qui s'arrondissent de manière à assumer la forme sphérique ou d'Oidium. Ces cellules résultent soit d'étranglement, soit de scission, soit des deux; on en voit aussi qui naissent d'un simple bourgeonnement. En même temps que ces cellules se forment, elles se gonflent. Elles ont l'air très vigoureuses et sont pleines d'un plasma granulé fortement réfringent. Les filaments mycéliens, eux aussi, font voir des articles plus ou moins gonflés et remplis du même plasma très réfringent. Ajouté à la préparation, un peu d'une solution étendue d'iodure de potassium iodé, teint ces cellules plasmatiques plus fortement que le reste du mycelium et que les cellules ordinaires de levure, donnant aux premières une couleur jaune grisâtre marquée, tandis que le reste de la végétation n'est pour ainsi dire pas coloré. Un repos plus prolongé fait produire des spores à ces cellules plasmatiques, et plus on approche de cette phase qui donne les spores, plus leur coloration par l'addition d'iode sera intense. Lorsque la culture a reposé quelque 5 jours à

25 ° C., l'analyse y montre beaucoup desdites cellules en voie de donner des spores ou les ayant toutes développées, et durant les journées suivantes cette formation de spores augmentera beaucoup, et alors nous aurons un abondant développement. La spore, elle aussi, est teinte en jaune par l'iode. Aux diverses phases de l'évolution, on a ajouté de l'iodure de potassium iodé en dilution sans jamais observer la coloration en rouge

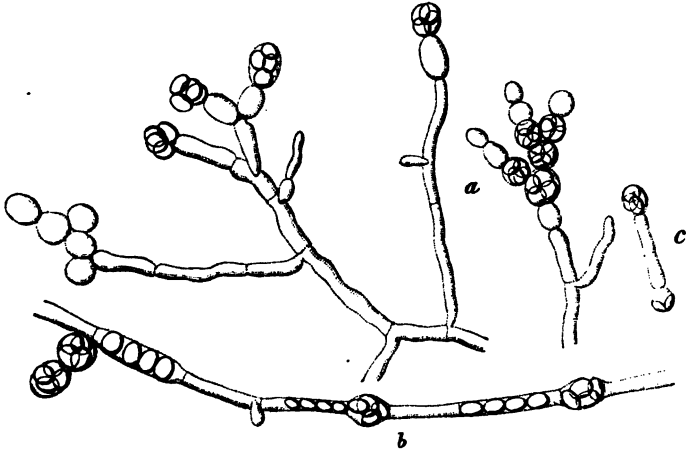


Fig. 3.

Végétations de spores. a, d'une culture sur eau de levure; b, d'une culture sur eau de levure gélatinisée et additionnée d'agar; c, d'une culture sur eau de levure. Ici, une spore germée a formé, en croissant, un filament mycélien, dans l'article terminal duquel de nouvelles spores viennent de se produire. 500/1.

brun qui caractérise le glycogène. Ce n'est pas simplement dans les cellules de la surface que se forment les spores; on les retrouve aussi, mais naturellement en moindre abondance, dans le liquide nutritif même. On trouve presque constamment 4 spores en chaque asque. De temps à autre, on peut y en trouver un nombre moindre; mais en beaucoup de ces cas on verra que les spores en apparence manquantes sont présentes à l'état rudimentaire. Je n'en ai jamais compté plus de quatre dans un asque. En général, la formation des spores commence dans les cellules les plus rapprochées de l'extrémité libre du filament, et même très souvent dans la plus extérieure, pour avancer de plus en plus vers le centre. On peut même rencontrer

des articles munis de spores jusqu'au coeur de la masse mycélienne. Les parois de la cellule mère s'effacent assez rapidement, laissant les spores libres; le plus souvent elles restent groupées quatre à quatre.

Si dans une goutte d'acide sulfurique un peu fort l'on introduit un peu de cette abondante végétation de spores, la presque totalité du mycelium et des cellules de levure s'y dissolvent, surtout si l'acide est concentré, et il ne reste que les spores. Elles ont subi une légère diminution de volume; mais leur forme souffre remarquablement peu de ce traitement; c'est l'inverse de ce que j'ai obtenu d'autres champignons de levure et, chose à remarquer, la petite masse de spores en contact avec l'acide sulfurique prend une belle couleur rose bien accentuée. Ce ton ressort d'autant mieux que l'acide est plus fort. En ajoutant à une culture à spores sur eau de levure renfermée dans un flacon Freudenreich un peu d'acide sulfurique concentré, soit par ex. $\frac{1}{6}$ du volume de cette eau, nous obtiendrons, en secouant, un fort dégagement d'air, qui soulèvera les parties de végétation non dissoutes par l'acide sulfurique, c'est-à-dire les spores; celles-ci, arrivées à la surface, y resteront en petits grumeaux roses, et regagneront le fond dès que le dégagement d'air cessera. Ce dépôt rouge garde longtemps sa couleur sans altération; on l'a même constatée six mois après. Le lavage à l'eau d'un grumeau de spores coloré par l'acide sulfurique, fait disparaître la couleur; mais celle-ci revient par le traitement à l'acide. La réaction est aussi franche dans les cultures anciennes (1 an) à spores que dans les nouvelles. Elle est de toute beauté surtout quand on prend une culture à spores sur eau de levure gélatinisée et principalement sur ce substratum additionné d'agar, ces milieux favorisant beaucoup la croissance de ce champignon; il donne alors surabondance de spores. En faisant la culture, dans un flacon Freudenreich, par raies sur une couche inclinée de l'un des milieux susdits, et versant sur la végétation qui se produit ici un peu d'acide sulfurique concentré, elle prend une magnifique couleur rose qui tire un peu sur le bleu. En général, toutes les cultures riches en spores donnent cette réaction chromatique; telles aussi les cultures sur pain ou riz. En regardant au microscope les spores traitées par l'acide, on verra que dans celles qui restent isolées dans la préparation la teinte s'est seulement foncée, tandis que dans les endroits

où les spores se sont agglomérées la teinte rouge est manifeste. On a la même réaction colorée que ci-dessus par les acides nitrique, chlorhydrique et fluorhydrique concentrés.

La grande résistance dont les spores font preuve en face des acides concentrés, est certainement unique parmi les champignons de levure. Beaucoup de cultures riches en spores et appartenant à diverses espèces de *Saccharomyces* typiques ainsi qu'au *Schizosaccharomyces octosporus*, ont été essayées avec de l'acide sulfurique concentré, dans un but de comparaison, mais aucune n'échappe à ce résultat que soit la cellule végétative soit la spore ont été fortement attaquées ou même entièrement dissoutes par le traitement à l'acide. Ici il n'est pas question de coloration en rouge¹⁾.

Si, choisissant une culture riche en spores, par ex. sur eau de levure, on en fait une préparation ordinaire à l'eau, et qu'on arrête spécialement son attention sur les spores détachées, isolées, dont la plupart apparaissent rondes, tandis que l'aspect des autres tend plus à la forme ovale, un examen plus approfondi de ces dernières révélera en beaucoup d'entre elles une ligne transversale fine qui partage la spore ovale en deux parties généralement inégales; on ne voit rien de tel sur les spores rondes. L'addition d'un peu d'iode de potassium iodé en dilution, rend cette ligne un peu plus manifeste. En refaisant cette opération, mais avec une goutte de liquide plus grosse pour y permettre une circulation facile des spores ainsi mises en mouvement, on constate cette ligne sur toutes les spores vues de profil, ligne fine qui paraît claire ou sombre suivant la mise au point, et qui fait le tour de la spore. C'est par exception qu'elle en occupe le milieu: en général, elle divise la spore en un gros

¹⁾ Outre les levures susmentionnées, on a également examiné l'influence de l'acide sulfurique concentré sur diverses moisissures, telles des végétations des *Penicillium Wortmanni*, *Gymnoascus flavus*, *Anixiopsis stercoraria*, *Aspergillus glaucus* et *Sterigmatocystis nidulans*. Toutes ces végétations présentaient une abondante fructification par asques. Les végétations des deux premières espèces furent entièrement dissoutes par l'acide, tandis que pour les trois dernières les ascospores échappaient à son action dissolvante. D'autre part, tandis que chez l'*Anixiopsis stercoraria* et l'*Aspergillus glaucus* ces organes sont demeurés incolores, chez le *Sterigmatocystis nidulans* ils ont pris une couleur violette tirant sur le bleu, ce qui constitue donc une nouvelle réaction chromatique.

segment et un petit, et si, dans la première préparation, cette ligne n'est pas visible sur la plupart des spores — surtout celles qui paraissent rondes —, la raison en est simplement que d'ordinaire la spore cherche à occuper dans la préparation une position telle que le plan de cette ligne annulaire soit horizontal, ce qui la fait coïncider avec le contour de la spore, cette dernière ayant une partie plus lourde. Vue de dessus, l'ascospore paraît donc circulaire, et son profil est plutôt oval, comme celui d'une boule un peu aplatie.

Or, que signifie cette ligne annulaire? Pour résoudre cette question, l'on a commencé par essayer de faire germer la spore, chose facile si l'on sème en moût de bière des spores mûres dans une chambre Ranvier. Si armé d'un microscope on surveille la germination dans cette chambre à la température du laboratoire, surtout en notant les spores dont le profil montre la transversale mentionnée, on verra dès la 4^e ou 6^e heure écoulée, les spores qui commencent à gonfler, la membrane se rompant alors suivant cette ligne. La

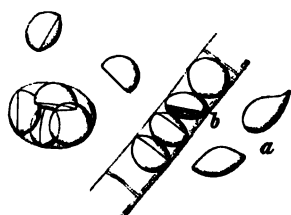


Fig. 4.
Spores. a, formes irrégulières.
1000/1.

spore est à double paroi et par conséquent munie d'un exosporium et d'un endosporium. L'exosporium se compose de deux valvules généralement inégales, qui s'appliquent l'une contre l'autre suivant une suture, qui le plus souvent a l'aspect d'une ligne fine, bien qu'en certains cas elle puisse aussi affecter la forme d'une nervure faisant le tour de la spore. En d'autres cas, la seule distinction des deux valvules de l'exosporium est que sous un certain jour la spore présente une moitié sombre et l'autre claire (fig. 4 b). La germination déchire l'exosporium de la spore suivant la suture. Ordinairement les deux valvules restent unies en un point, imitant les deux valves d'une coquille de moule, autour de la cellule gonflée. Peu après, l'on aperçoit sur celle-ci un petit bourgeon qui se forme et en quelques heures atteint des dimensions et pousse lui-même de nouveaux bourgeons; la spore elle-même peut aussi en émettre plusieurs. Si l'on suit ainsi la germination des spores dans la préparation au moût, on verra qu'elle procède par bourgeonnement

ordinaire, comme le montre la fig. 5. L'exosporium reste longtemps fixé sur la spore bourgeonnante.

Mûres et complètement développées, les spores sont pleines d'un plasma homogène, fortement réfringent, où l'on voit habituellement un ou plusieurs grains encore plus réfringents. De grandeur très variable, elles peuvent avoir un diamètre maximum d'environ 5 à $6\frac{1}{2} \mu$; mais d'ailleurs on peut trouver des spores d'un diamètre entre $3\frac{1}{2}$ et 8μ . L'ensemble de la forme est assez régulier; mais de temps à autre on peut rencontrer des spores d'aspect un peu irrégulier, comme on le voit en fig. 4, a. Les types reproduits ici peuvent se rencontrer dans toutes les cultures; mais c'est surtout dans les cultures sur blocs de plâtre qu'on les a trouvés fréquemment. Un traitement spécial fait constater que chez quelques-unes la suture occupe le

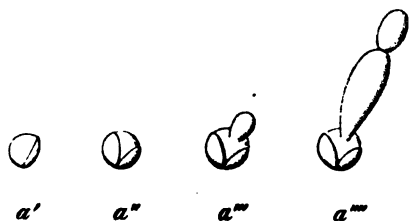


Fig. 5.

Spore en germination en chambre Ranvier avec du moût de bière, à la température ordinaire du laboratoire. a'' au bout de 2, a''' au bout de 4, a'''' au bout de 9 heures.
1000/1.

bord du côté plat, tandis que dans d'autres, même après due préparation, cette suture est invisible, bien qu'on ne puisse pas douter qu'elle existe réellement. En somme, il n'est pas toujours aisé de voir cette formation, surtout tant que la spore est encore dans l'asque. Pour bien l'étudier, ce qu'il y a de mieux à faire est de partir d'une culture sur un substratum contenant de l'eau de levure. Dans les cas où la suture des spores s'aperçoit nettement pendant qu'elles sont encore dans leurs asques, on a constaté que la position de telle ou telle spore par rapport aux autres dans la cellule mère est assez fortuite et dépend en partie de la forme de cette dernière.

La structure de la spore peut aussi être observée d'une manière autre que celle ci-dessus indiquée. Ainsi, en faisant une préparation de culture à spores dans une goutte d'acide sulfurique concentré, l'observateur au microscope distinguera très nettement la suture, surtout s'il coude son instrument horizontalement. La préparation sera le théâtre d'une certaine circulation, qui fera voir telle spore de différents côtés et, comme le

plan de la suture de la spore se place volontiers horizontalement, on y gagne précisément une chance de bien voir de profil cette formation. En baissant avec précaution le tube du microscope de manière à l'appuyer légèrement contre le couvre-objet, on peut obtenir que dans la préparation en question l'exosporium de la spore se partage suivant la suture. Les deux valvules de cet exosporium se placent alors comme les deux valves d'une coquille de moule se tenant par la charnière, ou séparées l'une de l'autre si la pression a été trop forte. On n'a rien constaté dans la cellule; son contenu a dû être dissous par l'acide. En traitant par l'acide sulfurique, on notera également que l'une des valvules de l'exosporium, la plus grande, est aussi la plus épaisse. Le maximum d'épaisseur ainsi constaté dans la paroi de l'exosporium, a été d'environ $1\ \mu$. Si une spore n'a pas été traitée par le susdit acide, on ne peut pas la faire éclore par pression suivant la suture. Soumise à cette pression, elle se délayera simplement, sans aucune séparation en exosporium et endosporium.

C'est donc l'exosporium que le traitement par l'acide sulfurique teint en rouge. Je n'ai découvert nulle part de mention relative à cette réaction sur les spores de champignons; en tout cas, jamais encore on ne l'a observée chez les champignons de levures. Par contre, on l'a observée chez beaucoup de spores d'autres plantes et de grains de pollen¹⁾. La réaction colorante est attribuée à ce que ces organes seraient pourvus d'une membrane cutinisée, insoluble dans l'acide concentré, et ce serait ainsi cette membrane que l'acide colorerait en rouge.

Ce qui précède permet d'admettre que dans mon espèce de levure l'exosporium des spores contient une substance subérisée. Nombre d'autres réactions viennent encore corroborer cette hypothèse. Ainsi les spores sont colorées en brun jaunâtre par l'iode joint à l'acide sulfurique étendu et de même par le chlorure de zinc iodé; dans l'acide chromique concentré elles ne se dissolvent qu'après y avoir séjourné quelque temps, et elles sont insolubles dans un liquide cupro-ammoniacal; quand on les chauffe dans une forte lessive de potasse, on a une réaction qui colore fortement en jaune.

¹⁾ J. Sachs, Lehrbuch der Botanik, 1873, p. 35 et 36.

W. Behrens, Hilfsbuch zur Ausführung mikroskopischer Untersuchungen im botanischen Laboratorium, 1883, p. 297.

La présence de cette membrane cutinisée met la spore en état de bien résister à l'influence des agents extérieurs, tels que l'humidité, la dessiccation, la putréfaction, etc.

Les expériences faites en chambre humide sur la germination des spores méritent une plus ample mention. Ainsi, en semant sur moût de bière dans une chambre Ranvier quelques spores, qu'il vaut mieux tenir séparées, tout au plus en groupes

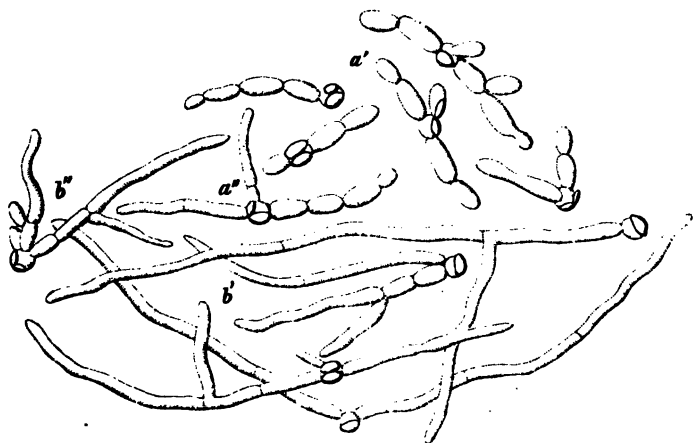


Fig. 6.

Des spores en germination. a' au bout de 24 heures, a'' au bout de 42 heures sur moût; b' au bout de 24 heures, b'' au bout de 42 heures sur eau de levure. Température ordinaire du laboratoire. 500/1.

de quatre, et maintenant la chambre à la température du laboratoire, on verra qu'en 4 ou 6 heures la plupart des spores débiteront par germer, par voie de gonflement et éclatant l'exosporium en deux parties, puis pousseront des bourgeons. Durant les heures suivantes, ce bourgeonnement se poursuit très activement (fig. 6, a'). Toutefois, on notera que pendant la deuxième journée, si les cellules de levure continuent à croître, c'est par ce que chaque cellule à part elle s'étend de plus en plus en longueur, c'est-à-dire assume la forme de filament mycélien et se cloisonne; en d'autres termes, la tendance devient alors de former un mycelium, et les spores qui alors seulement commencent à germer, vont le faire de cette même manière; elles pousseront d'abord un petit bourgeon, qui va s'al-

longer et former un long fil, d'où peuvent partir des branches latérales, et qui se cloisonnent. Toutefois, ces fils de mycelium peuvent souvent pousser sur les côtés des cellules de levure. En général, le mode d'évolution est comme ci-dessus, mais on n'en pourra pas moins voir nombre de spores en germination qui pendant quelque temps encore continueront à pousser de vrais bourgeons, ou bien il pourra encore se faire que la propagation ait lieu de l'une et l'autre manière (fig. 6, a^a). On n'a jamais observé de formation vraie de tubes germinatifs dans la germination de spores appartenant à la levure en question. Si la culture séjourne plus longtemps, les long fils de mycelium cloisonnés, et surtout ceux des colonies les plus rapprochées des bords de la chambre Ranvier, c'est-à-dire là où l'air a le meilleur accès, se diviseront en grandes cellules rondes, et le mycelium tendra à se scinder suivant les cloisons en articles plus indépendants, ressemblant un peu à ceux de l'Oïdium et faciles à séparer. Sept jours d'abandon permettent de constater la formation d'ascospores au nombre de quatre en beaucoup de ces grandes cellules rondes, ainsi que dans nombre des parties de mycelium limitées par deux parois transversales

Si, à la température ordinaire du laboratoire, l'on ensemence de la même manière quelques spores dans une chambre Ranvier renfermant de l'eau de levure, au bout de 4 à 6 heures elles se montreront également en voie d'éclater l'exosporium en deux parties, pour pousser un petit bourgeon durant les heures suivantes. Mais ce même bourgeon va s'accroître et s'étendre de plus en plus jusqu'à devenir un fil, qui se cloisonne (fig. 6, b^a). Ici il y a tendance à formation de mycelium, à l'inverse de la culture sur moût en chambre Ranvier où, comme nous l'avons vu, la première journée fait constater une tendance exclusive à former des cellules de levure. Dans cette eau de levure on peut pourtant trouver aussi un bourgeonnement seul ou avec formation de mycelium (fig. 6, b^a), mais en somme ici la formation des cellules de levure est purement secondaire. Trois jours de plus, et l'on constate que de nombreux fils de mycelium ont l'article terminal gonflé et comblé de plasma. Puis, les jours suivants amènent un ample développement de grandes cellules, pleines de plasma et généralement rondes, le plus souvent au bout des fils. Ces cellules proviennent d'un étranglement ou d'une scission des articles de mycelium ou d'un terme moyen entre

ces deux états. Enfin elles peuvent aussi être le fruit d'un bourgeonnement ordinaire. On voit aussi dans les parties des fils mycéliens les plus éloignées du bout, des articles particulièrement riches en plasma et plus ou moins enflés. On peut très aisément suivre sur la platine du microscope l'évolution ultérieure de ces cellules où abonde le plasma: on l'y voit, grenu et grumeleux, onduler avec lenteur et sans cesse et finir par se prendre en masses définies assez sombres, qui en peu d'heures s'accroissent par degrés en quatre rudiments de spores ordinairement, celles-ci évoluant alors jusqu'à maturité. Au bout d'environ 7 jours, on constate dans la chambre Ranvier une très copieuse sporulation.

En chambre Böttcher à ensemencement de spores peu nombreuses dans l'eau de levure gélatinisée, il y avait évolution de colonies composées presque exclusivement de mycelium typique. C'était par pure exception qu'on y trouvait quelques cellules de levure. Un abandon de huit jours à la température du laboratoire, produisit dans cette culture une exubérante et belle formation de spores, et cette formation se présentait surtout fréquemment dans les articles des filaments.

Un plus long séjour de pareilles cultures à spores dans les chambres humides fait dissoudre la paroi de la cellule mère, et alors les spores sont dégagées, groupées en général par quatre.

En poursuivant ainsi au microscope les phases de l'évolution, l'on peut aussi se convaincre que la formation d'asques n'est précédée d'aucune fusion de deux cellules, conséquemment, d'aucune copulation. J'avais arrêté mon attention spécialement sur ce point, puisque chez quelques autres levures on a récemment observé des formations de fusions qui, au sens de certains savants, doivent être interprétées comme dénotant une propagation par accouplement.

Par contre, si l'on sème dans une chambre humide un grand nombre de spores, l'état des choses se complique de suite. Alors les spores se dépouillant mutuellement d'air et de principes nutritifs — entre autres du sucre fermentescible dont il est question à propos du moût ou d'autre liquide nourricier analogue —, influent considérablement sur le type de croissance. Ainsi, en semant une quantité extraordinaire de spores dans une chambre Ranvier renfermant du moût, on les verra germer par un petit bourgeon qui, cependant, va s'allonger de manière à

former des filaments mycéliens, à l'instar de ce qui se passe dans l'eau de levure. Si l'onensemence ce dernier milieu d'un grand nombre de spores, on constate que celles qui se trouvent le plus près du bord, germent de la manière ordinaire, en poussant un bourgeon, qui s'allonge en un fil cloisonné; mais plus nous approchons du milieu de la chambre Ranvier, plus la germination est lente, et au centre de la chambre les spores ne germent pas du tout. Dans une pareille culture la croissance est vite terminée. Ainsi, dans une culture en eau de levureensemencée de beaucoup de spores, on a trouvé, après 2 jours d'abandon à la température ordinaire du laboratoire, la colonie que montre fig. 3, c. Ce type d'évolution était assez commun dans cette culture.

Comme on le voit par ce qui précède, la marche de l'évolution dans les cultures en chambres renfermant du moût de bière ou de l'eau de levure, pourvu qu'on n'ensemence pas un trop grand nombre de spores, est essentiellement la même que dans les cultures correspondantes des flacons; en d'autres termes, dans le moût, qui contient du sucre fermentescible, la croissance procède d'abord principalement par un bourgeonnement ordinaire, tandis que dans l'eau de levure elle procède de préférence par la formation de mycelium. Quant aux autres solutions nutritives qui contiennent un des sucres que la levure en question est capable de faire fermenter (voir plus bas), la marche de l'évolution est la même que dans le moût. Dans les liquides qui ne contiennent pas de sucre fermentescible, l'évolution sera essentiellement analogue à celle que présente l'eau de levure.

Même sur les terrains nutritifs solides, tels que le moût gélatinisé seul ou à l'agar, le *Saccharomycopsis capsularis* vient vite et avec facilité, surtout si les cultures y sont installées par raies.

Sur le moût gélatinisé, cette nouvelle levure débute par former une végétation sèche, légèrement veloutée, inégale et fortement plissée, d'une couleur blanc grisâtre. Elle se compose d'un mycelium détachant des cellules de levure, et de cellules de levure bourgeonnantes. La phase de la sporulation, avec arrondissement des articles du mycelium, commence bientôt après, et déjà au bout de 4 jours, à une température de 25 °C., il s'est formé quantité de spores. La végétation s'enfonce bientôt dans la gélatine et liquéfie celle-ci.

Sur le moût gélatinisé à l'agar, elle se multiplie promptement et avec une vigueur toute particulière, sans liquéfier la substance nutritive. La jeune végétation, qui présente un aspect sec, fortement plissé, inégal et légèrement velouté, est d'une couleur blanc grisâtre, tirant sur le brun-rouge. En poursuivant sa croissance, elle s'élève au-dessus du terrain nourricier sous forme d'une couche épaisse, qui finit par prendre une couleur de chocolat; peu à peu, son aspect devient un peu luisant d'humidité. Vue au microscope, la végétation présente le même aspect que sur le moût gélatinisé sans agar, et un repos prolongé donne beaucoup de spores.

Sur l'eau de levure gélatinisée seule ou additionnée d'agar, la croissance est aussi bonne, et l'aspect de la végétation rappelle celle qui se développait sur le moût gélatinisé, avec cette différence que la couleur tire un peu sur le rouge, et que la couche qu'elle forme sur l'eau de levure gélatinisée à l'agar est plus égale et mince. L'eau de levure gélatinisée se liquéfie bientôt; mais additionnée d'agar, elle reste à l'état solide. Avant la phase de la sporulation, la végétation est formée simplement d'un mycelium typique; toutefois, par pure exception, on peut rencontrer isolément sur l'eau de levure gélatinisée une cellule de levure détachée du mycelium. A la température de 25° C., on voit sur cette substance au bout de 3 à 4 jours, et quand elle est additionnée d'agar au bout de 2 à 3 jours, les articles des filaments du mycelium en voie de s'arrondir de façon à former les cellules ordinaires comblées de plasma. Alors il s'est déjà produit de nombreuses spores, et l'on en rencontre même de détachées et mûres, le plus souvent groupées par quatre, la paroi de la cellule mère s'étant dissoute. Sur ces deux substratums d'eau de levure, la sporulation est extraordinairement riche: surtout sur celle additionnée d'agar, on finira par trouver presque exclusivement des cellules sporogènes et des spores détachées. Ces organes se forment de la manière ordinaire; mais ici on en rencontre très souvent même dans les articles du mycelium, ce qui est assez rare dans les milieux précédemment nommés.

Sur le pain de seigle et sur le riz, la croissance du *Saccharomycopsis capsularis* est également assez bonne et présente des phénomènes ayant de l'analogie avec ceux observés sur les milieux solides d'eau de levure. La végétation finit par

prendre une teinte brunâtre, et il se produit de nombreuses spores. Ma levure ne liquéfie pas l'amidon.

Outre les milieux déjà mentionnés, j'ai également essayé une solution de peptone dans du bouillon de boeuf, un extrait de fumier de vache et une décoction de foin. Sur les deux premiers de ces milieux, notamment sur le bouillon, notre levure vient mal et ne croît qu'avec une extrême lenteur. Par contre, la croissance est passablement bonne dans la décoction de foin, au sein de laquelle il se produit un développement manifeste de mycelium accompagné de quelques cellules de levure, en même temps que la surface se couvre d'un voile assez compact, où un repos un peu prolongé donne de nombreuses spores. Les deux derniers liquides nutritifs ont été essayés principalement en considération du lieu où cette levure avait été découverte: des pâturages élevés dans les Alpes. Les recherches de Hansen sur la circulation des *Saccharomycètes* dans la nature, nous ont appris non seulement que les foyers primaires de ces organismes sont des fruits doux et juteux, mais encore qu'ils ont des foyers secondaires, spécialement dans les liquides du sol, et surtout dans les extraits de fumier et de parties végétales¹).

Nous avons vu plus haut que toutes les végétations superficielles présentent un aspect plus ou moins velouté. Cette apparence est causée par des filaments mycéliens qui s'élèvent en l'air, soit isolément, soit en faisceaux. En installant avec précaution sous l'objectif d'un microscope (sans employer de couvre-objet) une petite portion d'une pareille culture superficielle veloutée, de façon que la végétation ne soit pas dérangée, on peut observer ces formations mycéliennes. On aperçoit nettement les filaments parallèles, ainsi que leurs cloisons. En outre, surtout si la végétation provient d'une culture sur moût, on peut souvent constater que quelques-uns des filaments constituant la face extérieure d'un faisceau détachent par étranglement quelques cellules de levure. Dans une préparation ordinaire sous couvre-objet, lesdites formations n'apparaissent pas, parce que dans ces conditions les filaments se séparent de suite.

¹) Emil Chr. Hansen, Neue Untersuchungen über den Kreislauf der Hefenarten in der Natur (Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 2te Abth. X, I (1903)).

Par les modes de culture variés ainsi de diverses manières, j'ai obtenu constamment l'apparition des formations ci-dessus décrites, et d'elles seules, c'est-à-dire formation de cellules de levure et de mycelium et des ascospores, sans aucune forme de moisissure ou d'un autre type.

Un examen de l'action du *Saccharomycopsis capsularis* sur les différentes espèces du sucre fait constater qu'il peut faire fermenter le maltose, le dextrose, le lévulose et le d-galactose, et qu'il n'est pas capable de faire fermenter les l-arabinose, raffinose, lactose et saccharose; quant à ce dernier sucre, il est aussi incapable de l'intervertir. Dans de l'eau de levure additionnée de l'un des quatre sucres fermentescibles par le *Saccharomycopsis capsularis*, sa propagation est rapide et luxuriante, et la fermentation qu'il provoque, se manifeste nettement. La propagation procède de la même façon que dans le moût de bière: elle commence par un bourgeonnement actif, en sorte qu'il se forme un copieux dépôt de levure, en même temps que la surface se couvre peu à peu d'un voile. Ce dernier, qui est moins compact que ceux qui envahissent les cultures sur moût, est formé, à l'instar de ceux-ci, d'un mycelium dont les articles s'arrondissent peu à peu. Après un certain espace de temps, il y a souvent formation de quelques spores.

En eau de levure additionnée de l-arabinose, de raffinose, de lactose ou de saccharose, la croissance est très bonne; mais, contrairement à ce qui se passe dans les liquides contenant du sucre fermentescible par cette levure, dans lesquels, comme nous l'avons vu, il se produit un bourgeonnement abondant, des liquides contenant des sucres non fermentescibles par elle ne donnent naissance qu'à peu de bourgeonnement proprement dit. En revanche, il se produit au sein du liquide un abondant développement de mycelium. Dans l'eau de levure additionnée d'arabinose ou de raffinose, la végétation superficielle réussit à peine à masquer la surface entière, et dans ces deux milieux son aspect est un peu plus velu que dans les précédents. Dans l'eau de levure additionnée de lactose il n'y a pas de formation superficielle proprement dite, analogue à celle des autres liquides, mais seulement un développement bien marqué de mycelium, qui affleure la surface sans s'élever au-dessus. Si

des cultures dans ces liquides sont exposées pendant quelque temps à la température ordinaire du laboratoire, il se développe dans le voile une foule de spores. — Dans l'eau de levure additionnée de saccharose, le *Saccharomycopsis capsularis* forme un voile cohérent, assez compact, un peu inégal, sec et blanc, qui couvre toute la surface et se compose de mycelium qui, comme à l'ordinaire, s'étrangle peu à peu et s'arrondit, suivant les cloisons transversales, en articles. Un repos un peu prolongé donne de nombreuses spores.

Outre les substances susnommées, j'ai essayé aussi de l'eau de levure additionnée de mannite ou de dextrine. Ma levure n'a pu faire fermenter ni l'une ni l'autre. Dans ces solutions, la croissance est essentiellement la même que dans l'eau de levure additionnée d'arabinose ou de raffinose; seulement la végétation superficielle est encore plus épaisse et plus velue.

Quand un séjour prolongé de cultures à formation de voile a donné dans celui-ci un très grand nombre de spores, le voile prend ordinairement une couleur d'un brun clair.

Dans le moût de bière où, comme nous l'avons vu, le *Saccharomycopsis capsularis* vient vite et vigoureusement, j'ai trouvé pour la croissance végétative les températures principales suivantes:

Optimum	25—28° C.
Maximum	env. 38 $\frac{1}{2}$ ° »
Minimum	moins de 1 $\frac{1}{2}$ ° »

Les déterminations faites relativement aux limites de température de la formation de voile, ont donné pour résultat qu'il s'était formé quelques voiles en îlots

au bout de 11 jours à	34—35° C.
» 9 mois à	3—4° »

A 36° et à 1 $\frac{1}{2}$ °, il n'y avait pas formation de voile.

On sait que c'est en installant les cultures sur bloc de plâtre qu'on obtient, dans les *Saccharomyces* proprement dits, les meilleures conditions du développement de spores. Aussi la plupart des déterminations relatives aux spores ont-elles été faites de cette manière. Bien que, pour la levure qui nous

occupe, la culture sur plâtre donne une sporulation moins abondante que sur les milieux solides à eau de levure, j'ai employé aussi, dans un but de comparaison, la culture sur bloc de plâtre, afin de déterminer l'influence de la température sur la formation de spores. Toutefois, j'ai constaté que cette formation avait les mêmes températures fondamentales, n'importe quels fussent ceux des milieux précités où se fit la culture. Voici ce que j'ai trouvé pour ces températures principales de la formation de spores :

Optimum . . . 25—28 ° C.

Maximum . . 34¹/₂—35 ° »

Minimum . . . 5—8 ° »

La température optima de la sporulation sur bloc de plâtre et sur les milieux susnommés à eau de levure, semble coïncider avec l'optimum de la croissance végétative. Il paraît qu'à la température ordinaire d'un appartement il se produit aussi des spores en quantité égale; mais dans ce cas le développement est un peu plus lent. — Il est à remarquer ici que dans les cultures faites sur bloc de plâtre la suture de la spore ressort moins nettement ou pas du tout, même après traitement par une solution d'iode ou par acide sulfurique. Dans ces cultures il apparaît aussi, comme nous l'avons vu plus haut, des formes irrégulières de spores.

Les déterminations ci-dessus mentionnées fournissent des éclaircissements non-seulement sur la classification de la nouvelle espèce, mais encore sur la biologie générale des *Saccharomycètes*. On sait que Hansen, en 1886 (*Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg II*, 106), et plus tard, s'appuyant sur nombre de preuves expérimentales (*Comptes-rendus du Lab. de Carlsb. V*, 68 (1902)), établissait cette thèse applicable à tous les *Saccharomycètes* que la température maxima de la sporulation est inférieure à celle du bourgeonnement, et que la température minima de la sporulation est supérieure à celle du bourgeonnement. Les analyses décrites dans ce qui précède, corroborent ces assertions.

Nous avons vu que le *Saccharomycopsis capsularis* fait fermenter le moût de bière. Ainsi, dans un moût d'env. 13,5 % Ball., j'ai trouvé

après 27 jours d'exposition à la température ordinaire du laboratoire

			5,66 % en vol. d'alcool		
—	4 mois	—	6,92	—	—
—	7	—	7,15	—	—
—	10	—	6,88	—	—

Dans ce cas la limite de la production d'alcool se trouve donc aux environs de 7 %.

Dans de l'eau de levure additionnée de 20 % de dextrose j'ai trouvé

après 7 mois d'exposition à 25 ° 6,88 % en vol. d'alcool

—	10	—	7,23	—	—
---	----	---	------	---	---

Ici encore, la limite paraît se trouver à 7 % environ.

Nous allons maintenant examiner de plus près les résultats de mes recherches microscopiques et expériences physiologiques sur le *Saccharomycopsis capsularis*. Si, donnant un coup d'oeil rétrospectif, nous nous demandons quels sont les caractères essentiels qui distinguent cette levure nouvelle de toutes les autres, je peux remarquer que ce qui m'a frappé de prime abord, c'était l'ensemble de sa façon de croissance, la végétation, en s'élevant au-dessus de la surface du milieu nutritif, ayant un aspect velouté et présentant, vue au microscope, un développement très fort et bien marqué de mycelium. Toutefois, ces propriétés, si bien prononcées qu'elles soient, ne constituent en réalité nullement une différence essentielle entre cette levure et les vrais *Saccharomyces*; elle a de commun avec ceux-ci des caractères aussi importants que le bourgeonnement et la sporulation et, en outre, le développement de mycelium. Hansen a été le premier qui a constaté des formations mycéliennes dans le genre de *Saccharomyces*, particulièrement chez le *Saccharomyces Marxianus*, la levure basse de Carlsberg N° 1 et le *Saccharomyces Ludwigii*¹⁾, dans de vieux voiles et dans de vieilles cultures sur milieu nutritif solide. Même quand de vieilles spores du *Sacch. Ludwigii* germaient, il constatait qu'elles

¹⁾ Voir, pour la première des trois levures ici citées, les Comptes-rendus du Laboratoire de Carlsberg II, 145 (1888), et V, 4 (1900); pour la deuxième, les mêmes Comptes-rendus II, 42 (1883), et pour la troisième, III, 56 (1891), ainsi que le Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. V, 664 (1889).

sont susceptibles de développer un mycelium typique et cloisonné. Plus tard, des formations analogues chez les autres *Saccharomyces* proprement dits, ont été aussi décrites par Will, Lindner, et d'autres. Il appert donc que ces formations mycéliennes sont actuellement bien connues dans le genre *Saccharomyces*; seulement, elles sont moins bien prononcées.

Il ressort donc de ce qui précède que la levure décrite dans ce mémoire a bien des caractères de commun avec les véritables *Saccharomyces*; mais la plus forte raison pour empêcher de la rattacher à ce genre, dont cependant elle se rapproche tant, est la structure ci-devant décrite de la spore; car cette structure se distingue de celle de toutes les levures connues jusqu'ici¹⁾.

En dehors de l'espèce qui m'occupe, la littérature ne connaît qu'une levure dont les spores aient également deux membranes; mais ces deux espèces divergent fortement l'une de l'autre par toute une série de caractères, et surtout par le fait que l'autre espèce n'a pas l'exosporium divisé en valvules.

Cette espèce est celle que Robin a introduite dans la littérature sous le nom de *Cryptococcus guttulatus*²⁾. Plus tard, des savants l'ont dénommée *Saccharomyces guttulatus*, et Buscalioni³⁾ constata qu'elle développe des endospores. Dequis lors, Wilhelmi⁴⁾ a réussi à faire germer ces endospores. D'après ses observations, ces organes sont munis d'une membrane double. La spore affecte ce mode de germination qu'elle se gonfle et que par là la membrane extérieure se brise en un point quelconque. Le germe pousse hors de l'ouverture, et la membrane rompue et renversée se rétrécit peu à peu en un petit reste de forme indéfinie. La germination et la croissance ultérieure ont lieu par bourgeonnement. Il n'y a pas, à la membrane extérieure de la spore, de formation de suture analogue à celle que nous avons constatée chez le *Saccharomycopsis capsularis*.

¹⁾ Une recherche et un aperçu de la structure et de la germination des spores chez les *Saccharomyces*, ont été donnés par Hansen dans les Comptes-rendus du Lab. de Carlsb. III, 44 (1891).

²⁾ Robin, Des végétaux qui croissent sur les animaux vivants. (Paris 1847).

³⁾ L. Buscalioni, Il *Saccharomyces guttulatus* Rob. (Malpighia X, 281 (1896)).

⁴⁾ A. Wilhelmi, Beiträge zur Kenntnis des *Saccharomyces guttulatus* (Buscalioni). (Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 2te Abth. IV, 305 (1898)).

Du moment que la spore du *Saccharomyces guttulatus* possède les deux membranes de l'espèce décrite par moi, je les considère toutes deux comme appartenant au même genre. Me basant sur la ressemblance de ce genre au *Saccharomyces*, je lui ai donné le nom de *Saccharomycopsis* et, comme nous l'avons déjà vu, elle entre naturellement comme genre nouveau dans la famille des *Saccharomycètes*. Quant au nom spécifique de la nouvelle levure: *Saccharomycopsis capsularis*, je l'ai choisi à cause de la structure et la germination particulières de la spore, qui avec ses deux valvules déhiscentes a tant de rapport avec les capsules de certaines plantes supérieures¹⁾.

J'ajouterai ici une description systématique de ce nouveau genre et des deux espèces qu'elle comprend.

***Saccharomycopsis*, novum genus.**

Levures bourgeonnantes et donnant des endospores. La spore est munie de deux membranes et germe par bourgeonnement.

***Saccharomycopsis guttulatus* (Robin), Schiön.²⁾**

(Synonymes: *Cryptococcus guttulatus*, Robin; *Saccharomyces guttulatus*, aut.)

Cellules ellipsoïdes, ou ovales-oblongues. Chaque asque renferme 1 à 4 spores. Quand la spore germe, l'exosporium se rompt en un des pôles ou latéralement, et le bord est toujours irrégulier. L'exosporium, se resserrant insensiblement, finit par former un petit reste amorphe. Température optima de la croissance végétative: 35 à 37° C.

Intervertit le saccharose. Fait fermenter le dextrose.

Se trouve dans le canal digestif des lapins et, plus rarement, des cobayes, comme aussi dans les excréments de ces animaux.

Se développe sur certains milieux nutritifs artificiels, p. ex. la glycérine à agar additionnée d'acide tartrique et de dextrose.

¹⁾ On peut obtenir le *Saccharomycopsis capsularis* en s'adressant au laboratoire de M. Král de Prague.

²⁾ Je donne la description de cette espèce d'après les mémoires de Buscalioni et de Wilhelmi (voir au bas de la page 123), ainsi que d'après L. Buscalioni e O. Cassagrandi, *Sul Saccharomyces guttulatus* (Rob.) (Malpighia XII, 59 (1898)).

Saccharomycopsis capsularis, n. sp.

Mycelium typique et bourgeonnement. Ordinairement 4 spores dans chaque asque. La forme ordinaire de la spore est celle d'une boule aplatie, d'un diamètre de $3\frac{1}{2}$ à 8 μ . Quand la spore germe, l'exosporium s'entr'ouvre en formant deux valvules ordinairement inégales, qui le plus souvent restent unies en un point et demeurent attachées pendant longtemps à la spore germée. L'exosporium est teint en rose par l'acide sulfurique et par certains autres acides minéraux. Température optima de la croissance végétative: 25 à 28°, maxima: 38 $\frac{1}{2}$ °, minima: moins de 1 $\frac{1}{2}$ ° C. Température optima de la sporulation: 25 à 28°, maxima: 34 $\frac{1}{2}$ à 35°, minima: entre 5 et 8° C. Les milieux liquides se couvrent promptement d'un voile bien marqué, blanc, inégal et velu, les milieux solides présentant également une végétation blanche, veloutée, plus ou moins inégale, qui sur le moût gélatinisé additionné d'agar prend au bout de quelque temps une couleur de chocolat.

Fait fermenter les maltose, dextrose, lévulose et d-galactose, mais non les l-arabinose, raffinose, lactose et saccharose. Ne sécrète pas d'invertine.

Découvert dans de la terre prise à un pâturage élevé des Alpes suisses.

Se développe bien dans moût de bière, eau de levure seule ou bien additionnée d'un des sucres précités ou de dextrine ou de mannite; de plus, sur moût gélatinisé seul ou à agar, eau de levure gélatinisée seule ou à agar; enfin sur riz et pain.

Septembre 1903.

TABLE DES MATIÈRES

Études sur les bactéries dites Sarcines et sur les maladies qu'elles provoquent dans la bière par N. HJELTE CLAUSSEN	64
I. Isolation des Pédiocoques qui se trouvent dans la bière et dans la levure	66
II. Morphologie	70
III. Physiologie	73
IV. Récapitulation et remarques finales	81
Une espèce nouvelle de <i>Saccharomyces</i> : <i>Sacch. Saturnus</i> Klöcker, ayant des spores caractéristiques par ALB. KLÖCKER	84
Sur la classification du genre <i>Penicillium</i> , et description d'une espèce nouvelle formant des asques par ALB. KLÖCKER	92
Nouveau genre de la famille des <i>Saccharomycètes</i> par H. SCHIÖN- NING	103

FEB 8 1915

Carlsberg Laboratoriumet
COMPTES-RENDUS

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG

6^{me} VOLUME, 3^{me} LIVRAISON

COPENHAGUE

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP

IMPRIMERIE DE THIELE

1905

Prix: 4 Kr. 00 Øre

Toutes les indications thermométriques sont *centigrades*.

kgr.	kilogramme	l.	litre
gr.	gramme	cc.	centimètre cube
cgr.	centigramme	cm.	centimètre
mgr.	milligramme	mm.	millimètre
		μ .	micromillimetre

LES COMPTES-RENDUS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE CARLSBERG

paraissent par livraisons à des époques indéterminées. A mesure qu'il en paraîtra un nombre suffisant pour faire un volume, les abonnés recevront un titre en même temps qu'une table des matières, avec l'indication de la période qu'embrasse le volume.

Saccharomycopsis capsularis, n. sp.

Mycelium typique et bourgeonnement. Ordinairement 4 spores dans chaque asque. La forme ordinaire de la spore est celle d'une boule aplatie, d'un diamètre de $3\frac{1}{2}$ à 8 μ . Quand la spore germe, l'exosporium s'entr'ouvre en formant deux valvules ordinairement inégales, qui le plus souvent restent unies en un point et demeurent attachées pendant longtemps à la spore germée. L'exosporium est teint en rose par l'acide sulfurique et par certains autres acides minéraux. Température optima de la croissance végétative: 25 à 28°, maxima: 38 $\frac{1}{2}$ °, minima: moins de $\frac{1}{2}$ ° C. Température optima de la sporulation: 25 à 28°, maxima: 34 $\frac{1}{2}$ à 35°, minima: entre 5 et 8° C. Les milieux liquides se couvrent promptement d'un voile bien marqué, blanc, inégal et velu, les milieux solides présentant également une végétation blanche, veloutée, plus ou moins inégale, qui sur le moût gélatinisé additionné d'agar prend au bout de quelque temps une couleur de chocolat.

Fait fermenter les maltose, dextrose, lévulose et d-galactose, mais non les l-arabinose, raffinose, lactose et saccharose. Ne sécrète pas d'invertine.

Découvert dans de la terre prise à un pâturage élevé des Alpes suisses.

Se développe bien dans moût de bière, eau de levure seule ou bien additionnée d'un des sucres précités ou de dextrine ou de mannite; de plus, sur moût gélatinisé seul ou à agar, eau de levure gélatinisée seule ou à agar; enfin sur riz et pain.

Septembre 1903.

SUR LA MÉTHODE DE KJELDAHL POUR LE DOSAGE DE L'AZOTE

PAR

S. P. L. SØRENSEN ET C. PEDERSEN.

Dans un mémoire qui a récemment paru dans la *Zeitschrift für physiol. Chem.*¹⁾ MM. Fr. Kutscher et H. Steudel ont publié de nombreuses analyses par lesquelles ils cherchent à démontrer que la méthode de Kjeldahl pour le dosage de l'azote, bien qu'applicable aux matières hétérogènes telles que la viande, le pain, l'urine etc., ne l'est nullement quand on a à analyser des composés chimiques déterminés. Ces deux auteurs se sont appliqués à déterminer par la méthode de Kjeldahl la teneur en azote de certains corps d'une haute importance au point de vue physiologique, tels que créatine, créatinine, acide urique, lysine et histidine. Mais ils sont toujours arrivés à des résultats fort variables: quelquefois ils ont trouvé une teneur en azote se rapprochant de celle donnée par le calcul; mais plus souvent ils ont trouvé une teneur trop basse d'un ou plusieurs pour cent, et dans quelques-unes de leurs analyses elle ne s'élevait qu'à $\frac{3}{4}$ ou $\frac{2}{3}$ de celle que leur avait donnée la théorie.

Or, si ces résultats étaient réellement sûrs, c'est-à-dire, s'ils étaient trouvés par un emploi juste et exact de la méthode de Kjeldahl, les deux auteurs étaient dans leur droit en rejetant cette méthode, non seulement pour l'analyse de composés chimiques déterminés, mais pour le dosage d'azote en général, toutes les fois qu'il s'agirait d'analyses tant soit peu exactes. Mais il n'en est pas ainsi. Il ressort des éclaircissements — peu abondants du reste — que donnent les auteurs sur le procédé

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. **39**, 12 (1903).

qu'ils ont suivi, qu'ils doivent s'être écartés, sur plus d'un point essentiel, non seulement de la méthode originale de Kjeldahl, mais aussi des modifications qu'on y a apportées ultérieurement. Ceci est vrai (en ce qui concerne nombre des essais faits par les deux auteurs) pour la durée du chauffage, et particulièrement pour la manière dont ils ont effectué l'oxydation par le permanganate de potasse.

D'abord, en ce qui concerne la durée du chauffage, il est dit dans le premier mémoire de Kjeldahl¹⁾ que deux ou trois heures suffiront ordinairement si l'on emploie un mélange d'acide sulfurique concentré et d'acide sulfurique fumant ou d'acide phosphorique anhydre, tandis que l'emploi de l'acide sulfurique anglais seul exige un chauffage prolongé pour que le liquide puisse devenir incolore ou presque incolore. Cependant, d'après l'expérience de Kjeldahl, il n'est point nécessaire — du moins en ce qui concerne les substances protéiques et leurs dérivés — de faire bouillir jusqu'à ce que le liquide soit devenu tout à fait incolore, et même si l'on emploie l'acide sulfurique anglais, les matières protéiques, après deux ou trois heures de chauffage, seront suffisamment décomposés pour que l'oxydation par le permanganate de potasse puisse s'effectuer sans perte d'azote. Quand il s'agit d'autres substances, où l'azote se trouve lié d'une autre manière qu'il ne l'est dans les matières protéiques, il faut, suivant Kjeldahl, prolonger le chauffage avec l'acide sulfurique anglais, ou bien se servir d'un mélange d'acide sulfurique et d'acide phosphorique anhydre. Comme on le sait, une série d'expériences minutieuses, faites surtout par des chimistes allemands, ont montré que l'addition de métaux ou d'oxydes métalliques (oxyde de cuivre, mercure, oxyde de mercure, ou mélanges de ces oxydes) exerce une influence fortement accélérante sur la réaction, bien qu'en aucune circonstance il ne soit recommandable de faire bouillir pendant moins d'une demi-heure. Par conséquent, il n'est point étonnant que Kutscher et Steudel soient arrivés à des résultats trop bas dans les expériences où la durée du chauffage varie de cinq minutes à une demi-heure et où, en outre, ils font souvent usage de l'acide sulfurique concentré seul, sans addition aucune. Si néanmoins dans un nombre très restreint de ces expériences, faites sur la créatine, ils

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. 2, Résumé français, p. 5 (1883). Zeitschr. f. analyt. Chem. 22, 372 (1883).

trouvent une teneur en azote se rapprochant de celle donnée par le calcul, on est amené à admettre des différences accidentelles survenues durant le chauffage; tout ce qu'on peut en conclure, c'est donc que la créatine est une substance très facile à analyser d'après la méthode de Kjeldahl. — On pourrait faire remarquer ici que dans les expériences très nombreuses faites dans le courant des années au laboratoire de Carlsberg d'après la méthode Kjeldahl, on a toujours pu constater qu'en réduisant le temps du chauffage à moins de deux ou trois heures, on s'expose à perdre de l'azote. Dans des expériences faites sur le lait et la bière, en se servant d'acide sulfurique, de mercure et d'oxyde cuivrique comme moyens de décomposition, il est arrivé parfois, avant que la décomposition fût réellement terminée, que le liquide a passé au vert pur, sans nuance brunâtre, — phénomène correspondant exactement à la façon dont se comportent les substances telles que la créatine, la créatinine et l'acide urique, lesquelles ne donnent point de coloration, ou tout au plus une teinte passagère, à l'acide sulfurique pendant le chauffage. D'autre part, il a été constaté maintes fois au laboratoire de Carlsberg que la réaction prend la marche voulue quand le liquide chauffé n'a que de l'acide sulfurique concentré sans autre addition qu'un peu d'oxyde cuivrique et que le chauffage est poussé — au moins pendant 3 heures¹⁾ — jusqu'à ce que le liquide soit devenu d'un vert pur sans teinte brunâtre. Somme toute, en effet, il importe naturellement peu, dans la majorité des cas, qu'il faille prolonger l'ébullition une heure de plus ou de moins, attendu que les ballons dans lesquels le chauffage se fait peuvent être abandonnés à eux-mêmes et sans aucune surveillance, pourvu qu'on ajoute un peu de cuproxyde seulement: c'est ainsi que même des substances très difficiles à décomposer se prêtent à la décomposition par une faible ébullition du jour au lendemain.

En ce qui concerne l'oxydation par le permanganate de potasse, divers chimistes ont admis que, pourvu que la décomposition par l'acide sulfurique soit effectuée comme il faut et qu'on la mène à bout, il est superflu d'ajouter le permanganate de potasse, et que cette addition peut même être préjudiciable

¹⁾ Il va de soi que dans des cas spéciaux on peut faire des exceptions à cette règle, lorsqu'en examinant des espèces particulières de substances on a pu constater qu'un aussi long chauffage n'est pas nécessaire.

en causant une perte d'azote. — A ce propos, on remarquera qu'il est naturellement inutile d'oxyder par le permanganate de potasse, s'il n'y a pas de substance organique qui se laisse oxyder ultérieurement, et souvent il en sera ainsi lorsque l'ébullition aura un peu dépassé le moment où le liquide passe au vert pur; mais il peut arriver aussi que la décomposition ne soit pas absolument achevée même après la coloration en vert, et dans ce cas l'emploi du permanganate de potasse s'impose. Il va sans dire qu'il en est de même dans toute analyse où le chauffage est interrompu avant que le liquide se soit teint en vert pur. Comme il peut conséquemment se produire des cas où l'utilisation du permanganate de potasse soit désirable, nous en faisons usage ici au laboratoire de Carlsberg dans tous les dosages d'azote d'après la méthode Kjeldahl, l'oxydation par le permanganate de potasse employé de la manière indiquée par Kjeldahl¹⁾ n'occasionnant jamais de perte d'ammoniaque. D'autre part, il n'est pas praticable d'imiter Kutscher & Steudel en ajoutant le permanganate au liquide refroidi et de le porter ensuite à l'ébullition; car alors une perte d'azote est pour ainsi dire inévitable. Aussi, dans son premier mémoire Kjeldahl en dissuade expressément dans ces termes²⁾:

»Mais il faut bien se garder, après que la couleur verte a apparu, de chauffer de nouveau fortement le liquide. En effet, il se produit alors une réduction avec formation d'un sel de protoxyde de manganèse et grand dégagement d'oxygène, et le liquide redevient clair, changement que j'ai souvent eu l'occasion de voir accompagné d'une perte sensible d'ammoniaque.«

Dans ce qui précède nous voyons une preuve péremptoire que, par la méthode par eux employée, Kutscher & Steudel n'ont point pu obtenir des résultats exacts, ni même concordants. Néanmoins, vu l'importance de la question, nous avons trouvé nécessaire de vérifier l'applicabilité de la méthode Kjeldahl vis-à-vis des substances étudiées par Kutscher & Steudel. Nous profitons de cette occasion pour donner une description sommaire de la manière dont le laboratoire de Carlsberg applique la méthode Kjeldahl et que nous avons suivie dans ce cas aussi. C'est essentiellement le même procédé que celui recom-

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. 2, Rés. franç. p. 6 (1883); Zeitschr. f. analyt. Chem. 22, 374 (1883).

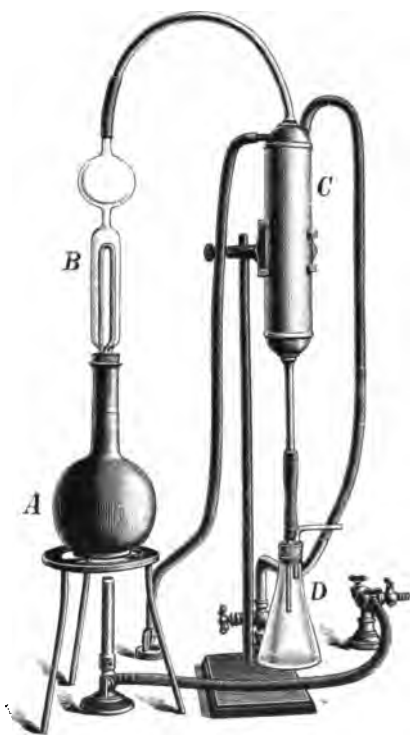
²⁾ Carlsb. Lab. Medd. 2, Rés. franç. p. 7 (1883).

mandé par Kjeldahl dans son premier mémoire. En conséquence, comme Kjeldahl l'avait déjà fait ressortir, il n'est pas applicable à l'analyse des alcaloïdes, ni à celle de toute matière azotée exigeant un traitement préparatoire avant le chauffage avec l'acide sulfurique (combinaisons nitrées etc.).

Dans un matras en verre d'Iéna à fond plat, à long col et de la capacité de 100 cc., on pèse une quantité telle de la matière à analyser que l'azote qu'elle renferme donne un total de 15 à 30 mgr.; toutefois, la quantité pesée doit préférablement ne pas excéder 0^{gr},4. De plus, pour les combinaisons très pauvres en azote et pour lesquelles, conséquemment, il est désirable d'opérer sur 1 gr., ou à peu près, de substance, il convient d'employer le double de la quantité ci-dessous indiquée d'acide sulfurique. S'il s'agit d'analyser une solution, on en enlève au moyen d'une pipette un volume convenable. Après addition de $\frac{1}{2}$ ou 1 cc. d'acide sulfurique, on réduit à un petit volume, par évaporation dans le matras de décomposition, soit sur une toile métallique au-dessus d'une petite flamme, soit — si cela présente des difficultés (en secouant ou écumant) — dans un séchoir à une température convenable. Ensuite, on procède de la même façon que pour l'analyse des substances solides. Après addition de 10 cc. d'acide sulfurique concentré et d'une dose minime (0^{gr},05 à 0^{gr},1) d'oxyde cuivrique, on place le matras sur une petite toile métallique, au-dessus d'un bec d'Argand. Cette toile métallique est revêtue d'amianté, où est ménagée une petite découpe circulaire qui permet au matras de reposer directement sur la toile métallique, en même temps qu'il est protégé contre la radiation de la lampe. On fait pencher le matras, de manière que le col repose sur un support, afin d'empêcher les éclaboussures pendant le chauffage. — D'abord on chauffe très faiblement, et l'on agite à plusieurs reprises le contenu du matras jusqu'à ce que le tout soit entré en dissolution et que le liquide, qui aura alors ordinairement pris une couleur foncée, ait presque atteint le point d'ébullition. Ensuite, c'est-à-dire, au bout de 10 à 15 minutes, on chauffe davantage, jusqu'à ce que le liquide commence à bouillir, après quoi l'on peut régler la lampe Argand de manière à permettre au contenu du matras de bouillir légèrement. Après cela, le matras ne demande ordinairement pas de surveillance ultérieure et peut rester en repos jusqu'à ce que le contenu ait pris une coloration vert pur sans nuance brunâtre,

ce qui prend des temps très différents, parce que cela dépend tant de la nature que de la quantité de la substance traitée; il ne faut pourtant jamais faire bouillir pendant moins de 3 heures, même quand le liquide aurait pris la coloration verte avant l'expiration de ce terme. (Voir la remarque à la page 128).

Après avoir fait bouillir suffisamment l'acide sulfurique, on enlève le matras et le place sur une assiette couverte de papier filtre. Puis, on oxyde aussitôt avec du permanganate de potasse sec et grossièrement pulvérisé, qu'on sème à la spatule dans le matras jusqu'à ce que, agitant la matière, on la voie se teindre en vert foncé sale grâce aux combinaisons manganésiques produites. Après repos et refroidissement, on ajoute de l'eau distillée, ce qui produit naturellement une élévation de température, de sorte qu'il faut encore refroidir le matras avant d'entreprendre la distillation en présence de lessive de soude.



La figure ci-contre montre l'appareil distillatoire. *A* est un matras en cuivre sans autres soudures que celle qu'on peut voir au col du matras dans le dessin. Dans ce matras on verse le mélange à distiller. On rince le ballon en verre par environ $\frac{1}{4}$ l. d'eau. Puis on ajoute 60 cc. de lessive de soude à 30%, et place le matras en cuivre aussi vite que possible dans la position montrée dans la figure. Alors on distille (sans addition de zinc), en retenant à l'aide de l'appareil laveur *B* la petite quantité de soude entraînée. L'appareil refroidisseur se compose d'un tube d'étain droit chemisé de cuivre, et le récipient, qui renferme 15 cc. d'acide sulfurique normal à env. $\frac{1}{7}$, est un ballon ordinaire de la capacité de $\frac{1}{4}$ l. et qui porte une marque gravée

indiquant le volume 100 cc. On interrompt la distillation lorsque le volume du produit distillé a atteint 100 cc., ce qui demande moins de 10 minutes.

Le titrage s'effectue par la méthode ordinaire de dosage iodométrique des acides. On se sert d'une solution d'hyposulfite de soude norm. au $\frac{1}{14}$ ($\frac{1}{14,04}$).

Pour cette méthode extrêmement rapide et pourtant très exacte, nous renvoyons les lecteurs aux communications de Kjeldahl¹⁾, où l'on trouvera une description complète tant de son exécution que de la préparation et la conservation de la solution employée d'hyposulfite. De temps en temps — et surtout chaque fois qu'on se sert de nouveaux réactifs (acide sulfurique concentré ou lessive de soude) — on fait des essais témoins dans lesquels 0^{gr},5 de sucre de canne pur est traité d'une manière identique à celle dont se fait une analyse réelle. — Le calcul est extrêmement simple: Si dans l'essai témoin les 15 cc. d'acide sulfurique norm. à env. $\frac{1}{7}$ exigent a cc. de solution d'hyposulfite, tandis qu'une analyse réelle n'en demande que b cc., il s'ensuit que la quantité pesée de l'analyse a renfermé $a \div b$ mgr. d'azote.

Voilà comment ont été effectués tous les dosages ci-après indiqués, sauf la variété de la durée de l'ébullition (pour chaque essai, on trouvera des indications précises à ce sujet).

1. Créatine.

On a employé une créatine (puriss. cryst. Schuchardt, Goerlitz) qui, desséchée dans le vide à une température de 95° jusqu'à réduction à un poids constant, n'a perdu que 9,82% d'eau, tandis que le calcul en demande pour une molécule d'eau de cristallisation 12,07%.

En douze heures, 1^{gr},5229 perdirent 0^{gr},1496 dans le vide à une température de 95°, mais plus rien quand on poursuivit la dessiccation.

Pour une teneur en eau de 9,82%, la créatine contient
28,95% d'azote.

Par la méthode de Dumas on a trouvé 28,98% —

— Kjeldahl — 28,79% — (28,65 à 28,94).

0^{gr},1268 ont donné 32^{cc},40 d'azote, mesuré à 18° et sous une pression de 750 mm.

¹⁾ Carlsb. Lab. Medd. 2, Résumé franç. p. 9 (1883), et 2, Res. franç. p. 193 (1888); Zeitschr. f. analyt. Chem. 22, 378 (1883), et 31, 451 (1892).

Dosages par la méthode Kjeldahl.

Nos des essais	Quantités pesées de substance, en gr.	Volumes (en cc.) d'hypo-sulfite correspondant aux quantités d'ammoniaque	Teneurs en azote %	Remarques
1	0,0907	26,05	28,72	{ Faible chauffage, sans ébullition, la nuit durant; puis légère ébullition pendant quatre heures.
2	0,0989	28,60	28,92	{ Additionné de 0,8 ^r , 1 de sucre de canne ¹ ; chauffé et bouilli comme N° 1.
3	0,0830	23,80	28,68	Comme N° 2.
4	0,0988	28,40	28,74	{ Additionné de 0,8 ^r , 2 de sucre de canne; chauffé et bouilli comme N° 1.
5	0,0806	23,30	28,91	Comme N° 2.
6	0,0800	23,00	28,75	{ Ajouté 0,8 ^r , 1 de sucre de canne. Amené en cinq minutes à l'ébullition, puis bouilli pendant une heure, le liquide ayant alors pris la coloration verte sans teinte brunâtre.
7	0,0890	25,50	28,65	Comme N° 6, bouilli pendant 2 heures.
8	0,0915	26,35	28,80	— 6, — — 3 —
9	0,0945	27,35	28,94	Comme N° 1, c'est-à-dire, sans sucre de canne.
		Moyenne: 28,79		

Il ressort de quelques-unes de ces expériences (N°s 6—8) que la créatine est du nombre des substances qui, bouillies avec l'acide sulfurique concentré, perdent facilement et vite leur azote sous forme d'ammoniaque.

2. Créatinine.

Dans ces expériences on a employé une créatinine impure (Merck). Tandis que le calcul avait assigné à la créatinine pure une teneur en azote de 37,21⁰%, on a trouvé par la méthode de Dumas 34,39⁰%
— — — — — Kjeldahl 34,09⁰% (33,81 à 34,35).

0,8^r, 1130 ont donné 34^{cc}, 0 d'azote, mesuré à 18⁰, 9 et sous une pression de 759 mm.

¹) Pour les substances qui, comme la créatine, sont solubles dans l'acide sulfurique concentré et que l'on peut faire bouillir dans cet acide sans qu'elles se carbonisent, il est souvent pratique d'ajouter une petite dose d'une substance organique non azotée, telle que le sucre de canne, qui par ébullition avec l'acide sulfurique donne une forte carbonisation. Alors, si l'on fait bouillir jusqu'à ce que le liquide ait verdi sans brunir, on a — de même que ceci est le cas pour les corps azotés qui, chauffés avec l'acide sulfurique, se carbonisent — un signe visible que la décomposition peut être considérée comme achevée.

Dosages par la méthode Kjeldahl.

Nos des essais	Quantités pesées de substance, en gr.	Volumes (en cc.) d'hypo-sulfite correspondant aux quantités d'ammoniaque	Teneurs en azote %	Remarques
10	0,1155	39,35	34,07	Comme N° 1, c'est-à-dire, sans sucre de canne.
11	0,0673	22,95	34,10	— " 2, — avec 0,8 ^r , 1 de sucre de canne
12	0,0614	20,95	34,12	— " 2, — — —
13	0,0674	23,15	34,35	— " 2, — — —
14	0,0675	23,00	34,07	— " 1
15	0,0695	23,50	33,81	— " 2
		Moyenne :	34,09	

3. Acide urique.

On a employé de l'acide urique, dont la teneur calculée en azote est de 33,39%

Par la méthode de Dumas on a trouvé 33,48%

— Kjeldahl — 33,33% (33,30 à 33,35).

0,8^r, 1220 ont donné 35^{cc}, 80 d'azote, mesuré à 18°, 4 et sous 756 mm. de pression.

Dosages d'après Kjeldahl.

N° 16. 0,8^r, 0907 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 30^{cc}, 20 de solution d'hypo-sulfite (33,30% d'azote) (bouilli comme N° 1).

N° 17. 0,8^r, 0967 répondaient à 32^{cc}, 25 de solution d'hypo-sulfite (33,35% d'azote) (bouilli comme N° 2).

4. Combinaisons de lysine.

Quant aux combinaisons pures de lysine — obtenues par la décomposition de substances protéiques —, nous n'avons eu l'occasion d'analyser qu'une seule, à savoir la combinaison hy-dantoinique préparée par le procédé de Herzog¹⁾ à l'aide de l'isocyanate de phényle et dont la teneur théorique en azote est de 15,33%.

Par la méthode de Kjeldahl nous avons trouvé 15,23%.

N° 18. 0,8^r, 1363 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 20^{cc}, 76 d'hypo-sulfite (15,23% d'azote) (bouilli lentement en une nuit jusqu'à obtention du vert sans brun).

D'un autre côté, nous avons examiné d'assez nombreuses

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 525 (1902).

combinaisons préparées par voie synthétique et qui, bouillies avec l'acide sulfurique concentré, se comporteront certainement tout comme la lysine naturelle. Ainsi, il y a quelque temps, l'un de nous¹⁾ a décrit une série de combinaisons dérivées de l'acide α - δ -diaminovalérique et dont l'azote pouvait facilement être dosé par la méthode Kjeldahl. Pareillement, nous avons fait l'examen de quelques composés dérivés de l'acide racémique α - ε -diaminocaproïque (γ -lysine rac.) que nous avons également préparé par voie synthétique²⁾.

Pour les expériences effectuées en premier lieu, nous nous sommes servis d'un γ -chlorure rac. de lysine à l'état brut. Tandis que le calcul avait donné pour les teneurs en chlore et en azote respectivement 32,35 % et 12,81 %, nous n'avons trouvé que 30,89 % de chlore et

d'après Dumas 12,63 % d'azote

— Kjeldahl 12,52 % — (12,43 à 12,61).

0^{gr},2260, titrés avec du nitrate d'argent en excès, puis filtrés et retitrés avec une solution de rhodanure d'ammonium, ont demandé 19^{cc},52 d'une solution de nitrate d'argent norm. à env. $\frac{1}{10}$ (1 cc. \approx 3^{mg},576 de chlore), correspondant à 30,89 % de chlore.

0^{gr},3137 donnèrent 34^{cc},60 d'azote, mesuré à 18^o,2 et sous une pression de 758 mm. (12,63 % d'azote).

N^o 19. 0^{gr},1914 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 24^{cc},13 d'hyposulfite (12,61 % d'azote (bouilli comme N^o 1).

N^o 20. 0^{gr},2055 répondaient à 25^{cc},55 d'hyposulfite (12,43 % d'azote). (Ayant chassé l'acide chlorhydrique à l'aide d'acide sulfurique dilué, nous avons ajouté de l'acide sulfurique concentré, et fait bouillir de la même manière que pour N^o 1).

Les combinaisons de lysine sont, en effet, du nombre des substances qui, par ébullition avec l'acide sulfurique conc., abandonnent assez difficilement tout leur azote sous forme d'ammoniaque. Nous nous en sommes convaincus par deux expériences où la durée de l'ébullition a été réduite à 2 heures; une addition d'acide phosphotungstique n'y a rien changé³⁾.

N^o 21. 0^{gr},1773 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 21,cc75 d'hyposulfite (12,27 % d'azote). (Après 1^h/₄ heure

¹⁾ S. P. L. Sørensen, Comptes-rendus du Labor. de Carlsb., Vol. 8, p. 32 (1903).

²⁾ Quant à la préparation de l'acide α - ε -diaminocaproïque racémique, on trouvera des renseignements provisoires à ce sujet dans le chapitre qui termine le mémoire qu'on vient de citer (page 60).

³⁾ Conférez Henderson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 322 (1900).

d'ébullition, le liquide était d'un vert exempt de brun; l'ébullition n'a duré que 2 heures en tout).

N° 22. 0^{gr},1771 répondaient à 21^{cc},70 d'hyposulfite (12,25 % d'azote). (On avait ajouté 3 cc. d'une solution phosphotungstique aqueuse à 50 %, et la durée totale de ébullition n'était que de 2 heures).

Après une recristallisation convenable, le «chlorure racémique de lysine» s'est trouvé pur.

Trouvé: 32,08 % de chlore et 12,74 % d'azote.

Calculé: 32,35 % — — 12,81 % —

0^{gr},1438 demandaient, au titrage fait comme ci-dessus, 12^{cc},90 de la solution susmentionnée de nitrate d'argent, correspondant à 32,08 % de chlore.

N° 23. 0^{gr},1925 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 24^{cc},52 d'hyposulfite (12,74 % d'azote). (Après deux heures d'ébullition, la solution était d'un vert pur sans brun; puis, on a continué l'ébullition pendant trois heures).

En partant du chlorure non recristallisé de lysine, nous avons préparé, par le procédé de Herzog¹⁾, la combinaison de phénylisocyanate de lysine et ensuite le composé hydantoïnique; la teneur en azote de ce dernier déterminée par la méthode Kjeldahl était de 15,18 %, la théorie ayant donné 15,33 %.

N° 24. 0^{gr},1507 ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 22^{cc},87 d'hyposulfite (15,18 % d'azote) (en faisant bouillir légèrement pendant la nuit, jusqu'à coloration en vert pur).

Les expériences qu'on vient de décrire ont pour résultat que la méthode de Kjeldahl s'adapte très bien à l'analyse des composés dont il s'agit ici; dans le cas présent comme d'habitude, la méthode Kjeldahl donne des résultats trop faibles d'une quantité à peu près inappréciable, de même que ceux de la méthode Du-mas pèchent par un très léger excès.

¹⁾ Voir l'endroit cité.

ÉTUDES SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS

PAR

S. P. L. SØRENSEN.

V. Acide α -amino- δ -oxyvalérique.

Jusqu'à ces dernières années, la sérine était le seul représentant connu du groupe des acides oxyaminés, groupe appartenant aux produits de dédoublement des substances protéiques; encore n'en avait-on démontré l'existence que par la décomposition d'une seule substance, savoir la séricine¹⁾. Les recherches faites ces dernières années ont modifié cet état de choses d'une manière essentielle. C'est ainsi que E. Fischer et ses collaborateurs sont parvenus à révéler l'existence de la sérine parmi les produits de dédoublement des substances protéiques les plus diverses, notamment la fibroïne²⁾, la corne³⁾, l'oxyhémo-globine⁴⁾, la sérum-albumine⁵⁾, l'édestine⁶⁾, la caséine⁷⁾ et la gélatine⁸⁾. Kossel et Dakin⁹⁾ avaient même trouvé la sérine dans les moins complexes des substances protéiques jusqu'ici connues: les protamines salmine et clupéine. Parmi les produits de dédoublement, on a rencontré également de nouveaux acides oxyaminés. C'est ainsi que E. Fischer a découvert, d'abord

¹⁾ Cramer: Journ. prakt. Chemie 96, 76 (1865).

²⁾ Emil Fischer et Aladar Skita: Zeitschr. physiol. Ch. 35, 221 (1902).

³⁾ Emil Fischer et Th. Dörpinghaus: ibid. 36, 462 (1902).

⁴⁾ Emil Abderhalden: ibid. 37, 484 (1903).

⁵⁾ Emil Abderhalden: ibid. 37, 495 (1903).

⁶⁾ Emil Abderhalden: ibid. 37, 499 (1903).

⁷⁾ Emil Fischer: ibid. 39, 155 (1903).

⁸⁾ Emil Fischer et Emil Abderhalden: ibid. 42, 543 (1904).

⁹⁾ Ibid. 40, 312 et 565 (1903).

dans la colle¹⁾ et plus tard dans la caséine²⁾, l'acide α -pyrrolidinecarbonique trouvé par Emil Abderhalden³⁾, d'après le procédé de Fischer, dans l'oxyhémoglobine et l'édestine. A. Orgler et C. Neuberg⁴⁾ ont signalé un acide tétraoxyaminocaproïque parmi les produits de dédoublement de la chondrosine, et enfin, l'année qui vient de s'écouler, plusieurs chimistes ont déclaré avoir trouvé, parmi les produits de décomposition de substances protéiques, des oxyacides aminés, ordinairement de constitution inconnue et dérivés d'acides assez riches en carbone. C'est ainsi que Zd. H. Skraup⁵⁾ croit avoir obtenu par hydrolyse de la caséine avec l'acide chlorhydrique, entre autres produits, les acides suivants: l'acide oxyaminosuccinique, l'acide dioxydiamino-subérique, un acide «caséanique», $C_9H_{16}N_2O_7$, qu'on doit vraisemblablement considérer comme un oxyacide diaminé tribasique, et enfin un acide «caséinique» $C_{12}H_{24}N_2O_8$, qui se présentait sous deux modifications différentes et qui était probablement un oxyacide diaminé bibasique. Par hydrolyse de la caséine également, mais avec l'aide de l'acide sulfurique, E. Fischer et E. Abderhalden⁶⁾ ont préparé un acide, $C_{12}H_{26}N_2O_8$, qu'ils supposent être de l'acide diaminotrioxododecylque. Enfin J. Wohlgemuth⁷⁾ pense avoir trouvé, par hydrolyse de la nucléoprotéide du foie, les acides oxyaminosubérique et oxydiaminosébacique. Cependant, la découverte des acides oxyaminés assez nombreux, que nous venons d'énumérer, parmi les produits de dédoublement des substances protéiques, ainsi que la fréquence dans la molécule protéique de la sérine (terme initial et de constitution la plus simple du groupe des oxyacides aminés), laissent présumer que lesdits produits de dédoublement pourraient bien, outre les acides oxyaminés mentionnés ci-dessus, en comprendre d'autres plus rapprochés de la sérine. C'est ce qui me fait croire à l'importance d'une méthode pour la préparation synthétique des acides oxyaminés analogues à la sérine, et dans ce qui va suivre, on trouvera une description

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 2660 et 3785 (1902).

²⁾ Zeitschr. physiol. Ch. 39, 155 (1903).

³⁾ Ibid. 37, 484 et 499 (1903).

⁴⁾ Ibid. 37, 418 (1903).

⁵⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 1596 (1904) et Zeitschr. physiol. Ch. 42, 274 (1904).

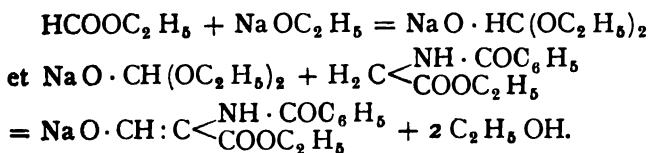
⁶⁾ Zeitschr. physiol. Ch. 42, 540 (1904).

⁷⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 4362 (1904).

détaillée d'une telle méthode, précédée d'un aperçu sommaire des synthèses les plus importantes des acides oxyaminés antérieurement publiés.

En employant la réaction Strecker bien connue, c'est-à-dire une addition d'ammoniaque et d'acide cyanhydrique à un aldéhyde, puis une transformation du groupe nitrile en carboxyle, E. Fischer et H. Leuchs¹⁾ ont préparé la sérine synthétiquement en partant de l'aldéhyde glycolique. En même temps, à partir de l'acide β -chlorolactique et de l'ammoniaque, ils ont préparé l'isosérine, et par réduction de cette dernière et de la sérine au moyen d'acide iodhydrique, ils ont obtenu et l'acide α - et l'acide β -aminopropionique, de sorte qu'on peut dès maintenant considérer comme établie la constitution de la sérine aussi bien que celle de l'isosérine. Dans la préparation de la sérine avec l'aldéhyde glycolique, le rendement fut peu considérable (9 % de la théorie); mais avec d'autres aldéhydes la méthode a donné de meilleurs résultats: c'est ainsi qu'avec l'aldol ils ont obtenu l'acide α -amino- γ -oxyvalérique (rendement 30 %); avec la galactose, l'acide galaheptosamique (rendement 20 à 25 %); avec l'arabinose g. et plus tard²⁾ avec l'arabinose dr., les importants acides glucosamiques g. et dr. (rendement env. 10 %); le dernier a pu être réduit en glucosamine dr., déjà connue comme un produit de dédoublement, plus particulièrement des glucoprotéides. Par un procédé semblable, c'est-à-dire en traitant de la glucosamine dr. par de l'acide cyanhydrique, C. Neuberg et H. Wolff³⁾ ont préparé les deux acides β -aminoglucoheptosamiques dr. qu'on peut obtenir par ce procédé.

Par un procédé différent du précédent, on a également réalisé la synthèse de la sérine. Par condensation de l'éther formique et de l'éther hippurique avec l'éthylate de sodium, E. Erlenmeyer jeune et F. Stoop⁴⁾ ont obtenu le sel de sodium de l'éther oxyméthylènehippurique:



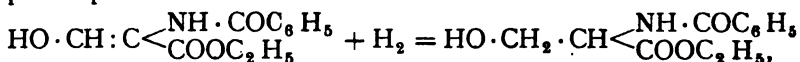
¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 3787 (1902).

²⁾ Ibid. 36, 24 (1903).

³⁾ Ibid. 35, 4018 (1902) et 36, 618 (1903).

⁴⁾ Ibid. 35, 3769 (1902).

L'éther oxyméthylènehippurique libre fut réduit en solution étherée par l'amalgame d'aluminium en présence d'eau ajoutée peu à peu :



L'éther benzoylsérique obtenu, chauffé avec l'acide sulfurique étendu, a donné de la sérine.

Enfin A. Ellinger¹⁾ et, indépendamment de lui, C. Neuberg et M. Silbermann²⁾ ont cherché en même temps à préparer la sérine avec de l'acide diaminopropionique en faisant agir sur le sel chlorhydrique ou bromhydrique (de l'acide diaminopropionique) la quantité de nitrite d'argent correspondante à l'un des deux groupes aminés; mais cette réaction a toujours donné de l'isosérine (rendement 50 % de la théorie). Dans son mémoire Ellinger dit qu'il a l'intention de continuer ces essais en partant de l'ornithine et de la lysine; on verra alors si même dans ces cas l'acide nitreux porte exclusivement sur le groupe-ment aminé en position α , ce qui vraisemblablement rendrait impossible l'obtention par ce procédé des oxyacides α -aminés.

La méthode employée par moi contraste avec celle que je viens d'exposer, en ce sens qu'à l'instar de mes synthèses antérieures des acides aminés³⁾ je me suis adressé à l'éther phtalimidomalonique, qui ne peut fournir que des composés α -aminés. L'acide aminé dont la préparation et les propriétés font l'objet du présent mémoire, est l'acide α -amino- δ -oxyvalérique. Cet acide me parut offrir un intérêt tout particulier, en raison des faits suivants: En premier lieu, il contient cinq atomes de carbone liés en série, phénomène que l'on retrouve chez quelques-uns des plus importants produits de décomposition des protéines (la leucine, l'acide glutamique, l'arginine et l'acide pyrrolidine- α -carbonique); en second lieu, je croyais possible de trouver dans cet acide oxyaminé la substance mère de l'acide pyrrolidine- α -carbonique qui, d'après les recherches de E. Fischer, se rencontre constamment parmi les produits de dédoublement des protéines. Il est vrai que les travaux très intéressants de E. Fischer et E. Abderhalden⁴⁾ ont démontré que l'acide pyr-

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 335 (1904).

²⁾ ibid. 37, 341 (1904).

³⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 1 (1902).

⁴⁾ Zeitschr. physiol. Ch. 39, 81 (1903) et 40, 215 (1903).

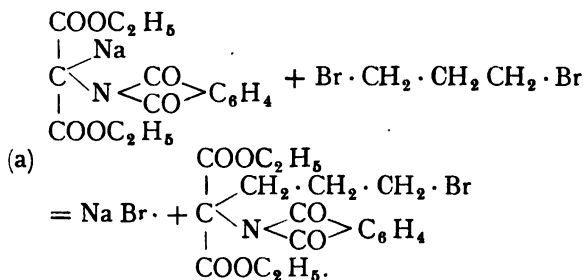
pyrrolidine- α -carbonique peut se rencontrer entre les produits de dédoublement de la caséine, même si l'on a évité tout traitement par des acides ou des alcalis forts; mais même par l'action combinée de la pepsine plus de l'acide chlorhydrique et de la pancréatine les auteurs n'ont pu obtenir plus d'une partie de la quantité d'acide pyrrolidine- α -carbonique que fournit la caséine dans un dédoublement ordinaire avec un acide. Sans doute une partie de l'acide pyrrolidine- α -carbonique se trouve dans le «polypeptide» restant non digéré et en petite quantité, après un traitement par la pepsine et par la trypsine. E. Fischer et E. Abderhalden ne disent pas quelle quantité de «polypeptide» ils ont trouvée dans leurs expériences susmentionnées; mais des expériences de digestion de la caséine exécutées de la même manière, quoique dans une autre intention, soit avec de la pancréatine seule, soit avec de la pepsine et ensuite avec de la pancréatine, ont donné à E. Abderhalden et P. Rona¹⁾ une teneur en «polypeptide» indigeste de 15 % dans le premier cas, tandis que dans le second elle était de 8 % seulement du poids de la caséine. C'est pourquoi il me semble qu'on n'a pas encore résolu d'une manière satisfaisante cette question très importante: si, oui ou non, l'acide pyrrolidine- α -carbonique est un produit primaire de dédoublement. Il ne découle pas de ces faits que l'acide pyrrolidine- α -carbonique soit contenu comme tel dans la molécule protéique; au contraire, on peut les expliquer en admettant la supposition faite par Fischer dans le premier de tous ses mémoires sur ce sujet, à savoir que ledit acide est un produit secondaire provenant d'une fermeture de la chaîne d'un dérivé 1.4 de l'acide valérique²⁾. Évidemment cette fermeture se produit sur une plus grande échelle par dédoublement avec de l'acide chlorhydrique fort que par scission d'enzymes. Ainsi qu'il ressort de ce qui va suivre, l'évaporation avec de l'acide chlorhydrique convertit l'acide α -amino- δ -oxyvalérique en acide pyrrolidine- α -carbonique, non intégralement, il est vrai, mais en quantité considérable. Par conséquent, il se pourrait qu'un groupement de ce genre faisant partie de la molécule protéique fût la substance mère de l'acide pyrrolidine- α -carbonique; mais il va de soi qu'il faut alors établir la présence de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique parmi les produits de dédouble-

¹⁾ Zeitschr. physiol. Ch. 42, 528 (1904).

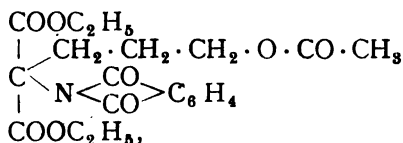
²⁾ ibid. 33, 169 (1901).

ment si l'on veut arriver à quelque chose de plus qu'une simple hypothèse. Dans le but d'éclaircir cette question, M. Jessen-Hansen vient d'ailleurs de commencer des expériences dans notre laboratoire.

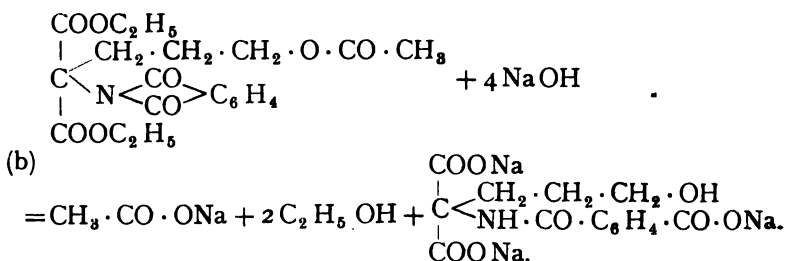
La préparation de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique à partir de l'éther phthalimidomalonique se rattache étroitement aux synthèses que j'ai décrites dans un mémoire antérieur. En traitant de l'éther phthalimido-sodomalonique par un grand excès de bromure de triméthylène, il se forme de l'éther γ -bromopropyle-phthalimidomalonique, qu'on débarrasse de l'excès de bromure de triméthylène par distillation à vapeur d'eau. Le dérivé bromopropylique ainsi formé est transformé par ébullition avec de l'acétate de potassium en acétate correspondant qui, traité par une lessive de soude, puis évaporé en présence de l'acide chlorhydrique, fournit le sel chlorhydrique de l'acide oxyaminé cherché. Les réactions auxquelles ces opérations donnent lieu sont les suivantes:



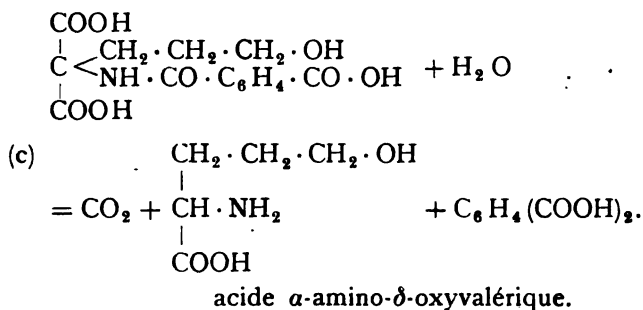
Traité par l'acétate de potassium, ce dernier composé donne du bromure de potassium et le dérivé acétique



qui, chauffé avec de l'hydroxyde de sodium, se décompose comme suit:

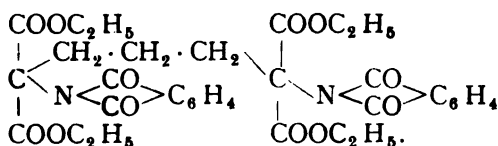


L'acide correspondant à ce sel sodique, se décompose à l'évaporation avec de l'acide chlorhydrique, comme suit :



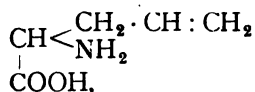
Reléguant aux parties suivantes du présent mémoire les détails de cette méthode, je vais faire ici quelques remarques se rapportant surtout à la marche plus ou moins complète de ces réactions.

Le rendement en éther γ -bromopropyle-phthalimidomalonique était d'environ 75 % de la théorie, de sorte que la réaction suivant l'équation (a) n'est pas tout à fait quantitative. Je n'ai pas réussi à séparer le bromure d'avec le produit accessoire formé en même temps: j'ai dû me servir, sans le purifier, du mélange obtenu, une espèce d'huile jaunâtre, qui m'a servi de point de départ pour les réactions suivantes. C'est pourquoi il était important pour moi d'établir la nature du produit accessoire, ou plutôt des produits auxquels il avait donné naissance dans un traitement à la lessive de soude et à l'acide chlorhydrique, produits qui se présentaient sous forme d'impuretés souillant l'acide α -amino- δ -oxyvalérique brut. Dans une réaction comme celle qu'exprime l'équation (a) on devrait s'attendre à obtenir comme produit accessoire une combinaison dans laquelle les deux atomes de brome du bromure de triméthylène fussent remplacés par le reste de l'éther phthalimidomalonique :



Comme on le voit facilement, cette combinaison dédoublée au moyen de l'hydroxyde de sodium et de l'acide chlorhydrique (comp. les équations (b) et (c)) donnerait de l'acide α - ε -diamino-

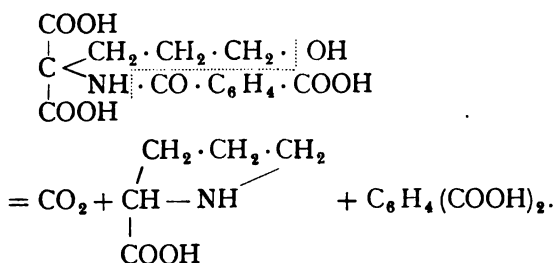
pimélique (voir aussi p. 147); mais cet acide, dont il est facile de reconnaître la présence, parce qu'il fournit un sel cuivrique presque insoluble, ne se trouve dans l'acide oxyaminé brut qu'en proportions très minimes (v. p. 160). D'un autre côté, on a pu reconnaître dans ce dernier de la glycolle, dont la formation s'explique le mieux en admettant un contenu d'éther phtalimidomalonique inaltéré ou régénéré dans l'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique. En effet, il ne serait pas étrange que l'éther phtalimido-sodomalonique, chauffé jusqu'à 160°—170° en présence du bromure de triméthylène, pût enlever à ce dernier du bromure d'hydrogène en donnant naissance à du bromure de sodium, de l'éther phtalimidomalonique libre et du bromure d'allyle, ou (au cas où deux molécules de bromure d'hydrogène seraient enlevées) de l'allylène symétrique. Cependant on a pu constater que dans cette réaction il n'y a pas eu dégagement de gaz, du moins pas en quantité suffisante pour expliquer la marche anormale de la réaction, de même qu'on n'a pu reconnaître la formation de bromure d'allyle qu'en proportions minimes. Sans doute on pourrait se figurer le bromure d'allyle réagissant avec une autre quantité d'éther phtalimido-sodomalonique, ou bien ce dernier enlevant le bromure d'hydrogène de l'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique déjà formé, dans les deux cas avec formation d'éther allyle-phtalimidomalonique qui, par décomposition avec de l'hydroxyde de sodium et de l'acide chlorhydrique, fournirait de la glycolle allylique :



mais ce composé, aussi facile à décèler (v. p. 186), ne se trouve pas non plus dans l'oxyacide aminé brut. Par conséquent, on a pu seulement établir ce fait que la masse principale du produit accessoire formé en même temps que l'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique est de constitution telle qu'une scission ultérieure donne de la glycolle. Même si le rendement en bromure (env. 75 %) doit être considéré comme très satisfaisant dans la préparation d'une substance organique, cette particularité qu'on n'a pu séparer le bromure d'avec l'impureté qui le souillait, a pour conséquence que la glycolle, à laquelle cette dernière donne naissance, crée plus tard des difficultés dans la pré-

paration de l'oxyacide aminé pur. Comme on verra plus loin dans la description détaillée de la purification de l'acide oxyaminé brut, on est parvenu, sans beaucoup de difficultés, à surmonter ces obstacles par la préparation du sel de cuivre de l'acide.

Pour ce qui concerne la seconde partie de la réaction, soit le traitement du bromure par l'acétate de potassium, avec décomposition subséquente du produit formé avec de l'hydroxyde de sodium et de l'acide chlorhydrique, il est à remarquer qu'elle n'est pas tout à fait quantitative ni elle non plus; car 15—20% de l'acide oxyaminé cherché se convertit en acide pyrrolidine- α -carbonique. Maintenant la question est de savoir à quel stade de la réaction cette formation d'acide pyrrolidine- α -carbonique a lieu. Un examen attentif des équations données à la page 142 fera voir que la formation d'un dérivé de l'acide pyrrolidine- α -carbonique est difficilement réalisable tant que le groupement phthalimide inaltéré fait partie de la molécule. Ce n'est qu'à la suite de la rupture de ce groupe par traitement avec de l'hydroxyde de sodium qu'on est naturellement amené à imaginer une fermeture de la chaîne pendant le chauffage subséquent en présence de l'acide chlorhydrique; car alors l'équation (c) subira la modification suivante:

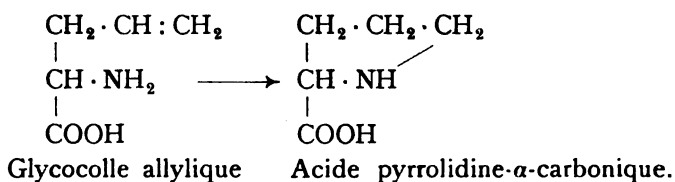


Nous avons déjà indiqué¹⁾ que l'acide α -amino- δ -oxyvalérique libre même, chauffé en présence de l'acide chlorhydrique, peut être transformé en acide pyrrolidine- α -carbonique, d'où il résulte qu'il est probable que partie, si non la totalité de l'acide pyrrolidine- α -carbonique, s'est formée de cette façon. D'un autre côté, le dédoublement que je viens de signaler de la combinaison phthalique, me semble être d'une telle simplicité que j'ai cru devoir y attirer l'attention à elle aussi; de plus, on a affaire ici à

¹⁾ Pour les détails, voir la 3^{me} partie de ce mémoire.

des conditions analogues à celles dans lesquelles un dédoublement de protéine est censé avoir lieu; car là aussi, le groupe NH avant la scission, est probablement rattaché à un groupe CO.

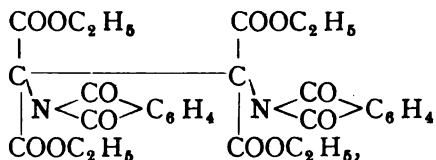
Enfin on pourrait penser que l'acide pyrrolidine- α -carbonique avait pris naissance par une transposition de la glycolle allylique de formation primaire, transposition rendue probable par un simple examen des formules que voici:



Si maintenant on considère que dans la préparation de l'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique, il se forme en même temps environ 25 % d'une combinaison produisant de la glycolle, et que l'acide oxyaminé brut contient une quantité à peu près correspondante d'acide pyrrolidine- α -carbonique, on verra qu'il est naturel de croire à une cause commune qui puisse expliquer les deux phénomènes. Nous avons vu dans ce qui précède qu'il serait naturel d'admettre une réaction du bromure de triméthylène sur l'éther phtalimido-sodomalonique avec formation du bromure de sodium, du bromure d'allyle et de l'éther phtalimidomalonique libre fournissant la glycolle, et nous avons également vu qu'avec une autre partie de l'éther phtalimido-sodomalonique le bromure d'allyle pourrait fournir une combinaison qui, scindée ultérieurement, devrait donner de la glycolle allylique. Or, si cette dernière pouvait être convertie en acide pyrrolidine- α -carbonique, on parviendrait à se rendre aisément compte de toutes les réactions en question. Mais cette conjecture ne s'accorde point avec les faits établis: ainsi qu'on va le voir vers la fin de ce mémoire, on peut facilement obtenir l'éther allyle-phtalimidomalonique en traitant l'éther phtalimido-sodomalonique par l'iodure d'allyle, et la glycolle allylique obtenue au moyen du dédoublement subséquent par l'hydroxyde de sodium et l'acide chlorhydrique présente des propriétés fort différentes de celles de l'acide pyrrolidine- α -carbonique et ne paraît nullement disposée à se changer en cet acide. C'est donc par pur hasard que les substances fournissant de la glycolle, d'une part et, de l'autre, l'acide pyrrolidine- α -carbonique, corre-

spondent passablement bien comme quantité; la genèse de celles-là n'a pas encore été éclaircie, tandis que celle de l'acide pyrrolidine- α -carbonique a probablement lieu comme on l'a indiqué plus haut (voir p. 145).

En traitant d'une manière convenable deux molécules-grammes d'éther phtalimido-sodomalonique par une molécule-gramme de bromure de triméthylène, on obtient l'éther triméthylène-diphtalimidomalonique ci-dessus nommé (voir p. 143), et qui par décomposition au moyen d'hydroxyde de sodium, puis évaporation en présence d'acide chlorhydrique, fournit l'acide α - ε -diamino-pimélique. En opérant d'une manière tout à fait analogue, mais en remplaçant le bromure de triméthylène par du bromure d'éthylène ou de l'iodure de méthylène, je suis arrivé à préparer l'acide α - ε -diaminoadipique respectivement α - γ -diaminoglutarique. Enfin j'espère obtenir l'acide α - β -diaminosuccinique à partir de l'éther diphtalimidomalonique:



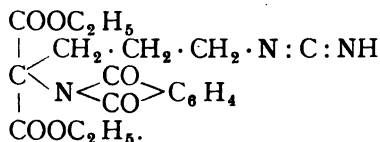
corps obtenu en traitant l'éther phtalimido-sodomalonique par l'éther phtalimido-bromomalonique très accessible et que E. Biilmann¹⁾ a le premier isolé. La synthèse de ces acides diaminés bibasiques acquiert un intérêt tout particulier grâce à la découverte de Zd. H. Skraup²⁾, publiée il y a quelques mois, de l'existence d'un acide diaminoadipique et d'un acide diaminoglutarique parmi les produits de dédoublement de la caséine. Nous n'avons pas à entrer ici dans les procédés de préparation de ces acides, ces procédés n'ayant pas encore été établis en détail; aussitôt qu'ils le seront, j'en donnerai une description détaillée dans un mémoire à part. Je tiens à remercier ici encore M. le Dr. Weis du concours qu'il m'a prêté au cours des recherches provisoires que je viens d'exposer.

Il est à présumer que par traitement avec des combinaisons convenables de métaux alcalins, l'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique pourra fournir plusieurs substances intéressantes. De

¹⁾ Studier over organiske Svovlforbindelser, Copenhague 1904, p. 92.

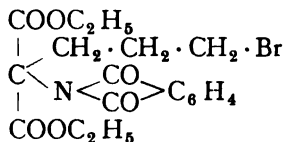
²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 1596 (1904), et Zeitschr. physiol. Ch. 42, 274 (1904).

même que le traitement avec l'acétate de potassium mène à l'acide α -amino- δ -oxyvalérique, il est probable qu'un traitement par le xanthogénate de potassium suivant la méthode de E. Biilmann¹⁾ provoquera la formation d'un produit capable de fournir l'acide α -amino- δ -thiovalérique. De plus, on a reconnu que, traité par le cyanamidure de sodium ($\text{NH}:\text{C}:\text{NNa}$) maintenant très accessible²⁾, le bromure cité déjà plusieurs fois fournit l'éther γ -cyanamidopropyle-phthalimidomalonique:



Si l'on soumet ce composé à un traitement par de l'ammoniaque ou des sels ammoniacaux, il est à présumer que le groupe cyanamide, fixant de l'ammoniaque se convertira en groupement guanidine ($\begin{array}{c} -\text{NH} \cdot \text{C} \cdot \text{NH}_2 \\ \text{NH} \end{array}$) et que, par conséquent, il sera possible de préparer synthétiquement l'acide α -amino- δ -guanidinovalérique, c'est-à-dire l'arginine ou un isomère de ce corps. M. A. C. Andersen se livre en ce moment dans notre laboratoire à des expériences dans ce sens.

1. Éther γ -brompropyle-phthalimidomalonique.



Dans un ballon de $\frac{3}{4}$ l. muni d'un réfrigérant ascendant surmonté d'un tube recourbé en U et renfermant du chlorure de calcium, j'ai traité $\frac{2}{5}$ molécules-grammes d'éther phthalimidomalonique³⁾ par 1 kgr. de bromure de triméthylène dans le bain d'huile à 165°—170°. Dès que le bain d'huile eut atteint cette

¹⁾ Studier over organiske Svovlforbindelser, Copenhague 1904.

²⁾ Le cyanamidure disodique ($\text{NaN}:\text{C}:\text{NNa}$) du commerce, trituré et lavé à l'alcool absolu et finalement lavé à l'éther, donne du cyanamidure monosodique qui, abandonné quelque temps dans le vide sulfurique a cédé tout l'éther adhérent et formé une poudre blanche et extrêmement fine.

³⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 10 (1902).

température, la réaction se déclara et parut terminée au bout de 3—4 heures. Durée totale de la chauffe: 5 heures. Ensuite, l'excès de bromure de triméthylène fut entraîné à la vapeur d'eau. On recueillit 910—915 grammes de bromure de triméthylène desséché, puis rectifié (consommation calculée $\frac{2}{3} \times 202 = 81$ grammes). Par refroidissement complet dans l'eau glacée, l'éther γ -bromopropyle-phthalimidomalonique prit une consistance sirupeuse, et après décantation de la solution aqueuse de bromure de sodium, j'ai pu employer directement le corps bromé dans le traitement ultérieur par l'acétate de potassium, dont description plus loin. Cependant, pour pouvoir déterminer exactement la teneur en corps bromé de l'huile obtenue, j'ai ordinairement dissous celle-ci dans l'éther, puis desséché la solution étherée au moyen de chlorure de calcium et enfin éliminé l'éther dans un ballon taré, terminant par des évacuations répétées. Le poids du résidu était de 158—160 grammes ($\frac{2}{3}$ molécules-grammes du composé bromé pèsent 170^{gr,4}), sa teneur en brome oscillait entre 14,41 % et 15,59 %, en azote entre 3,39 % et 3,54 %, tandis que la théorie exige 18,76 % de brome et 3,29 % d'azote. En supposant que la quantité tout entière de brome y existe sous la forme du bromure cherché, il en ressortirait que les produits obtenus renferment une quantité d'éther γ -bromopropyle-phthalimidomalonique comprise entre 76,8 et 83,1 %.

Pour nous rendre compte de la répartition de l'azote, prenons un exemple:

80 % de 159 gr. correspondent à 127^{gr,2} du corps bromé.

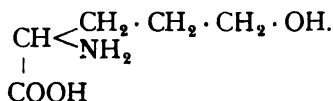
127^{gr,2} du corps bromé renfermant 3,29 % d'azote correspondent à 4185 mgr. d'azote, soit, par rapport à la totalité de l'azote ($\frac{2}{3} \times 14040 = 5616$ mgr.) 74,5 %.

Les $\frac{3}{4}$ environ de l'azote de l'huile existent donc à l'état de bromure, tandis que, comme nous l'avons vu dans l'introduction du présent mémoire (voir p. 144), le reste se retrouve dans des combinaisons exemptes de brome et qui, traitées par l'hydroxyde de soude, puis par l'acide chlorhydrique, donnent naissance à la glycolle.

Je n'ai pas réussi à débarrasser le corps bromé de ces impuretés, parce que le mélange obtenu se dissout facilement et complètement dans tous les dissolvants ordinaires, sauf l'eau et la ligroïne. Le composé bromé est presque insoluble dans l'eau, difficilement soluble dans la ligroïne, même à chaud, et

l'on ne peut le purifier par extraction à la ligroïne; car la teneur en brome de la partie entrant en dissolution reste à peu de chose près identique à celle du résidu.

2. Acide α -amino- β -oxyvalérique.



156 grammes d'éther γ -bromopropyle-phthalimidomalonique avec une teneur en brome de 14,76 % et une teneur en azote de 3,54 %, furent mis en jeu.

14,76 % de brome correspondent à 78,7 % de combinaison bromée, et 78,7 % de 156 gr. font 122 gr.,8.

122 gr.,8 de corps bromé avec une teneur en azote de 3,29 % renferment 4040 mgr. d'azote.

La teneur totale en azote étant de 5522 mgr., il s'en suit que la matière première contient

4040 mgr. d'azote en forme de composé bromé

1482 mgr. — — — de corps fournissant de la glycocolle, et autres impuretés.

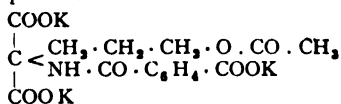
J'ai fait dissoudre le composé bromé dans un ballon de deux litres renfermant $\frac{1}{2}$ l. d'alcool chaud à 93 %. Ensuite j'y ai ajouté une solution chaude de 150 grammes d'acétate de potassium dans 200 cc. d'eau, solution qui avait été préalablement rendue neutre au tournesol par addition d'un peu d'acide acétique. L'addition de cette solution au corps bromé provoqua un léger trouble de consistance huileuse, que j'ai fait disparaître en ajoutant encore 100 cc. d'alcool. Puis, après avoir muni le ballon d'un réfrigérant ascendant, j'ai abandonné, pendant 20 heures, à la chaleur d'un bain d'eau en pleine ébullition. De cette manière j'ai obtenu une transformation complète de la combinaison bromée en l'acétate correspondant, car l'échantillon prélevé à donné, après évaporation de l'alcool, un résidu huileux qui, après des lavages répétés à l'eau, fut reconnu exempt de brome¹⁾.

¹⁾ A côté de la réaction principale, une ou plusieurs réactions secondaires se sont manifestement produites, car, par traitement avec de l'eau, le résidu huileux sus-indiqué est entré partiellement en dissolution en donnant lieu à une réaction fortement acide. L'acétate de potassium a probablement exercé une action saponifiante sur l'éther malonique et peut-être amené l'ouverture

Après refroidissement jusqu'à la température ordinaire, on verse la solution dans une capsule en porcelaine de quatre litres renfermant une solution de 100 cc. d'hydroxyde de sodium dans 300 cc. d'eau. Après un chauffage du mélange pendant trois heures, tout l'alcool pour ainsi dire, s'est évaporé, et la saponification (voir l'équation (b) p. 142) est vraisemblablement achevée; car, étendu avec de l'eau, l'échantillon prélevé reste tout à fait limpide. Après avoir refroidi le mélange dans l'eau glacée, je l'ai sursaturé de doses successives d'acide chlorhydrique concentré (en tout 600 cc.), puis j'ai fait évaporer au bain-marie, en agitant finalement à plusieurs reprises, ce qui fit prendre à la substance la consistance d'une bouillie claire. Celle-ci, outre des sels chlorhydriques de potassium et de sodium et de l'acide phtalique, renferme comme produit principal le chlorhydrate de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique (voir l'équation (c) p. 143) et en même temps, comme produits de transformation de l'oxyacide, le chlorhydrate de l'acide pyrrolidine- α -carbonique, enfin les produits de décomposition de l'impureté de la matière première: acide phtalique et chlorhydrate de glycolle.

Ayant, dans le but de séparer ces corps les uns des autres, trituré la masse en y ajoutant 300 cc. d'acide chlorhydrique concentré, j'ai refroidi à la glace, puis filtré à la trompe au travers d'une couche double de papier durci, puis lavé, avec 1 l., en tout, d'acide chlorhydrique à 33 %¹⁾, le mélange non dissout des sels chlorhydriques de potassium et de sodium et de l'acide phtalique. Après avoir fait évaporer au bain-marie les liquides filtrés et de lavage jusqu'à volume d'environ 200 cc. j'ai dilué avec un volume égal d'eau et extrait à l'éther le reste de l'acide phtalique²⁾.

du noyau phtalique, donnant ainsi naissance au sel potassique de l'acide phtalamique correspondant



et mettant en liberté l'acide acétique. Enfin, il est également permis de croire qu'une partie de l'acétate ait produit, par hydrolyse, l'oxyacide et l'acide acétique libre.

¹⁾ Cfr. ces mêmes Comptes-rendus 6, 25 (1902).

²⁾ Pour extraire totalement l'acide phtalique de la solution, qui en contient ordinairement env. 4 gr., il faut agiter à plusieurs reprises avec d'abondantes quantités d'éther, jusqu'à ce qu'on n'en obtienne plus. L'évaporation de la

La solution chlorhydrique débarrassée de l'acide phtalique fut chauffée au bain-marie dans un ballon afin de chasser l'éther, puis évaporée au bain-marie, avec agitations répétées vers la fin. La solution ayant alors pris une consistance sirupeuse, je l'ai abandonnée sur de l'acide sulfurique, afin de la débarrasser, autant que possible, de son eau. Ensuite, en refroidissant à la glace, j'ai traité la masse sirupeuse par 300 cc. d'alcool absolu, dans lequel les chlorhydrates des acides aminés entrèrent peu à peu, dans le courant de quelques heures, en solution, tandis que les chlorhydrates de sodium et de potassium y sont restés à l'état non dissous. J'ai filtré ces chlorhydrates à la trompe sur du papier durci et les ai lavés quatre fois à l'alcool absolu. Il est de toute nécessité d'effectuer ce traitement par l'alcool avec un soin minutieux, et il faut surtout avoir soin d'éliminer l'eau autant que possible, parce que les chlorures alcalins, qui entrent alors en solution, ne peuvent pas être éliminés plus tard, et ils sont susceptibles de causer des difficultés dans la préparation du sel cuivrique de l'oxyacide (voir p. 159).

La solution alcoolique obtenue, renfermant les chlorhydrates des acides aminés (l'oxyacide, l'acide pyrrolidinecarbonique et la glyocolle) fut diluée avec son volume d'eau et l'alcool distillé dans le vide. Il fallut alors débarrasser la solution aqueuse résiduelle de toute son acide chlorhydrique. Pour ce, on aurait évidemment pu avoir recours au carbonate d'argent. Voici cependant un procédé moins coûteux, bien qu'un peu plus compliqué: On dilue dans une grande capsule de porcelaine jusqu'à un volume d'un litre environ, puis on y ajoute au bain-marie et en remuant bien, de petites portions de céruse (200 gr. en tout), et l'on chauffe pendant six heures. Abandonné au repos jusqu'au lendemain, le dépôt fut filtré et soigneusement lavé à l'eau froide. Après ce traitement, la solution présentait encore une réaction fortement acide, et elle contenait quelque peu d'acide chlorhydrique et un peu de plomb. Toutefois une addition relativement insignifiante de carbonate d'argent humide suffit pour

solution chlorhydrique sus-mentionnée jusqu'à consistance huileuse, suivie d'un traitement renouvelé de cette dernière par l'acide chlorhydrique, permettrait d'en éliminer encore un peu de sel marin et d'acide phtalique; mais on risque alors que les évaporations répétées en présence de l'acide chlorhydrique aient pour conséquence de convertir d'assez grandes proportions de l'oxyacide en acide pyrrolidine- α -carbonique.

la faire réagir nettement alcaline, et dès lors elle ne contenait plus ni chlore ni plomb, mais bien un petit excès d'argent. J'ai ensuite filtré de nouveau et lavé à l'eau, puis j'ai précipité l'argent et neutralisé le liquide en y ajoutant goutte à goutte de l'acide chlorhydrique (finalement très étendu). Quand le liquide présentait une réaction neutre (c.-à.-d. quand elle faisait virer la couleur tant du papier rouge que du papier bleu de tournesol), il y avait toujours une quantité très peu abondante de chlore, provenant évidemment de ce que les chlorures alcalins n'avaient pu être éliminés complètement. Je procédai alors à une nouvelle filtration, mais de préférence après avoir laissé reposer jusqu'au lendemain, parce que sans cela le chlorure d'argent est susceptible de traverser le filtre.

La solution obtenue avait un volume total d'environ $2\frac{1}{2}$ l., et l'on reconnut que sa teneur totale en azote était de 5402 mgr., s'élevant ainsi à 97,8 % de celle de la matière première. La solution fut évaporée sous pression réduite jusqu'à un petit volume, puis filtrée à travers un petit filtre pour en séparer quelques flocons obscurs. Le liquide filtré fut évaporé au bain-marie, en remuant constamment vers la fin de cette opération, jusqu'à ce que la masse chaude commençât à se cristalliser; au refroidissement, la masse se prit entièrement en une pâte cristalline molle et faiblement colorée. On abandonna celle-ci jusqu'au lendemain sur de l'acide sulfurique afin de la débarrasser autant que possible de son eau. Cela fait, je l'ai broyée dans la capsule même en présence de 200 cc. d'alcool absolu. Au bout de deux ou trois heures de triturations répétées, tous les grumeaux avaient disparu, après quoi, la solution alcoolique jaune (A) (qui renfermait l'acide pyrrolidine- α -carbonique, mais seulement une petite quantité de l'oxyacide et de la glycocolle) ayant été filtrée à la trompe, le mélange non dissous et presque incolore des deux derniers acides aminés fut soigneusement lavé quatre fois à l'alcool absolu. Séché à l'air, le mélange de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique et de la glycocolle pesait 36^{gr},8 (B).

a. Isolation de l'acide pyrrolidine- α -carbonique de la solution (A). Nous avons vu que cette solution, dont la teneur en azote était d'environ 1100 mgr., renfermait, outre de l'acide pyrrolidinecarbonique, de l'oxyacide et de la glycocolle en proportions minimales. Mais j'y ai aussi trouvé, révélée déjà par la coloration jaune de la solution, la masse principale des

impuretés indéterminées qui se forment toujours dans les synthèses des corps organiques. J'ai mélangé la solution (A) avec une autre obtenue d'une manière analogue au cours d'une autre expérience.

Après avoir distillé l'alcool et redissous le résidu dans de l'eau, j'ai décoloré au moyen de noir animal et réduit le liquide filtré jusqu'à un petit volume. Ensuite j'ai filtré de nouveau et concentré jusqu'à consistance sirupeuse. En raison des impuretés qu'elle renfermait, la masse ne s'est prise que partiellement par abandon au-dessus de l'acide sulfurique. Après broiement de la masse avec de l'alcool absolu, comme décrit précédemment, il en restait encore 2 gr. à l'état non dissous; comme on pouvait s'y attendre, ceux-ci se composaient d'un mélange d'oxyacide et de glycocolle. Par évaporations répétées de la solution alcoolique, avec addition d'eau, j'en ai chassé tout l'alcool, puis redissous le reste huileux dans 200 cc. d'eau dans une capsule en porcelaine. J'ai ajouté à la solution 50 cc. d'acide sulfurique deux-normal et précipité l'acide pyrrolidine- α -carbonique en y versant avec précaution un petit excès d'acide phosphotungstique à 50 % environ. Au commencement, le sel phosphotungstique se précipita à l'état huileux présentant une teinte légèrement brunâtre; mais le précipité final se composait de beaux cristaux blancs, que le microscope nous montra comme de courts prismes à 4 pans, rappelant souvent ceux du spath calcaire. Abandonnée jusqu'au lendemain, la masse huileuse s'était complètement cristallisée et pouvait être concassée, après quoi je filtrai à la trompe et lavai quatre fois avec un peu d'eau froide. Le sel phosphotungstique est facilement soluble dans l'alcool qui, par conséquent, doit être éliminé entièrement avant la précipitation. L'eau chaude le dissout assez facilement, et il est loin d'être insoluble même dans l'eau froide, ce qui fait qu'il ne saurait être question d'obtenir un rendement tout à fait quantitatif par cette voie.

Pour arriver à un acide pyrrolidinecarbonique parfaitement pur, j'ai décomposé le précipité phosphotungstique originaire après l'avoir lavé, de la manière ordinaire, c'est-à-dire, à l'aide d'un petit excès d'eau de baryte saturée. La solution ainsi obtenue fut débarrassée de la baryte, par addition d'un petit excès d'acide sulfurique. Après avoir évaporé jusqu'à un volume de 150 cc. et additionné de 30 cc. d'acide sulfurique 2-normal, j'ai pré-

cipité par l'acide phosphotungstique de la même manière qu'au-paravant. Le précipité que j'obtins par cette seconde précipitation, fut décomposé au moyen de l'eau de baryte, et la solution ainsi obtenue, fut débarrassée de la baryte par un tout petit excès d'acide sulfurique. La filtration, puis l'évaporation du liquide au bain-marie, me donnèrent un résidu qui après refroidissement se prit totalement en une masse dure et facile à réduire en poudre. Cette masse, dont le poids était de $10^{\text{gr}},8$, avait une teneur en azote de 1145 mgr. et était constituée d'acide pyrrolidine- α -carbonique presque pur avec 1 mol. d'eau de cristallisation.

En ce qui concerne le rendement de cet acide, il faut bien entendu tenir compte de ce fait que la précipitation par l'acide phosphotungstique n'est pas complètement intégrale. J'ai donc cherché à me rendre compte de la proportion d'acide pyrrolidinecarbonique contenue dans les filtrats des deux précipitations par l'acide phosphotungstique. A cet effet, j'ai éliminé d'abord l'acide phosphotungstique à l'aide d'eau de baryte, puis l'excès de cette dernière au moyen d'une quantité exactement correspondante d'acide sulfurique; finalement j'ai fait évaporer au bain-marie. Le résidu qui en résulta, ne se prit pas au refroidissement; en reprenant par l'alcool absolu, on eut un reste non dissous ($1^{\text{gr}},5$ d'oxyacide + glycolle) et une solution alcoolique; après évaporation de l'alcool et dissolution du reste dans 100 cc. d'eau et 20 cc. d'acide sulfurique 2-normale on précipita par l'acide phosphotungstique. La précipitation totale exigea $\frac{1}{5}$ environ de la quantité d'acide phosphotungstique que la dernière des précipitations indiquées plus haut avait demandée, laquelle avait fourni $10^{\text{gr}},8$ d'acide pyrrolidinecarbonique renfermant 1145 mgr. d'azote. On peut donc évaluer approximativement l'acide pyrrolidinecarbonique en jeu à $\frac{1}{5} \times 10^{\text{gr}},8$, avec une teneur en azote de $\frac{1}{5} \times 1145 = 229$ mgr.

Les quantités sus-indiquées provenant de deux essais exécutés de la même manière, il ressort que la teneur en azote de la quantité d'acide pyrrolidinecarbonique formée dans un essai peut s'évaluer à $\frac{1145 + 229}{2} = 687$ mgr. d'azote, soit, par rapport à la teneur en azote de la matière première (éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique, 4040 mgr. d'azote, v. p. 150), 17 0/0.

$10^{\text{gr}},7$ de l'acide pyrrolidine- α -carbonique obtenu furent dissous assez facilement et presque totalement dans 100 cc. d'alcool absolu chaud. Après filtration, la solution, légèrement colorée, n'a pas donné de dépôt au refroidissement; mais si on la remue et la frotte à la spatule, on voit bientôt l'acide se déposer sous forme de beaux cristaux. Ayant abandonné la solution jusqu'au lendemain, je recueillis le dépôt qui, au microscope, se révéla sous forme de prismes à 4 ou 6 pans, parfois de lamelles quadrilatères.

Après quatre lavages avec un peu d'alcool absolu, puis dessiccation à l'air jusqu'à disparition presque complète de l'odeur d'alcool, l'acide attestait un poids de 4^{gr},7; abandonné jusqu'au lendemain à l'action de l'air, il pesait de 5^{gr},3, phénomène dû évidemment à ce que l'acide pyrrolidine- α -carbonique cristallise dans l'alcool à l'état anhydre, alors qu'abandonné à l'air atmosphérique, il absorbe 1 mol. d'eau de cristallisation. L'acide n'a été jusqu'à présent analysé, à ma connaissance, qu'à l'état anhydre, après dessiccation d'une manière quelconque, soit dans le vide sur l'anhydride phosphorique¹⁾ ou dans le vide à 40°²⁾.

0^{gr},5139 d'acide pyrrolidinecarbonique séché à l'air, perdaient facilement et rapidement dans le vide sulfurique 0^{gr},0697 (13,56 %); abandonné plus longtemps, l'acide ne changeait pas de poids. Un repos subséquent sur de l'eau pendant un jour, lui a fait absorber plus de 13,56 % d'eau, et dans un séjour prolongé sur de l'eau il en a continuellement attiré de petites quantités, ce qui a eu pour effet de le rendre un peu déliquescent. Abandonné ensuite à l'action de l'air, il perdit de l'eau et revint à son poids primitif de 0^{gr},5139; ce dernier ne varia plus, même après un séjour ultérieur à l'air.

1^{gr},1908 d'acide séché à l'air, laissés dans le vide sulfurique jusqu'à poids constant, ont perdu 0^{gr},1608 (13,50 %).

0^{gr},1623 de l'acide anhydre, correspondant à 0^{gr},1876 d'acide séché à l'air, ont donné 0^{gr},3100 d'acide carbonique et 0^{gr},1130 d'eau, ce qui, par rapport au poids de l'acide séché à l'air, correspond à 45,07 % de carbone et 6,74 % d'hydrogène.

0^{gr},1688 d'acide séché à l'air ont donné, au dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl, une quantité d'ammoniaque correspondant à 17^{cc},52 de solution d'hyposulfite³⁾, ce qui correspond à 10,38 % d'azote.

		Calculé	Trouvé	
C ₅	60,00	45,07	45,07	
H ₉	9,07	6,81	6,74	
O ₂	32,00	24,04		
N	14,04	10,55	10,38	
H ₂ O	18,02	13,53	13,56	13,50
<hr/> C ₅ H ₉ O ₂ N, H ₂ O		133,13	100,00	

L'acide pyrrolidine- α -carbonique séché à l'air, commença à fondre dans son eau de cristallisation au-dessous de 100°. Par

¹⁾ E. Fischer: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 459 (1901).

²⁾ E. Fischer: Zeitschr. physiol. Chemie 33, 164 (1901).

³⁾ Les solutions d'hyposulfite dont je me suis servi dans les essais relatés dans le présent mémoire, ont une concentration telle qu'un centimètre cube répond à 1 mgr. d'azote.

chauffage ultérieur, l'eau s'évapore, et l'acide se fige de nouveau pour ne devenir fusible qu'à 208 à 209° (corrigé). L'acide anhydre fondit à 210 à 211° (corrigé) et prit une teinte légèrement brune.

Je me suis servi de l'eau-mère et de l'alcool de lavage de l'acide pyrrolidine- α -carbonique cristallisé pour en préparer le sel cuivrique. Pour cela, on chasse l'alcool par distillation, reprend le résidu à l'eau et chauffe la solution aqueuse, décolorée par le noir animal, au bain-marie pendant deux ou trois heures avec du carbonate de cuivre en excès, puis on évapore au bain-marie, jusqu'à cristallisation abondante, la solution bleu foncé ainsi obtenue. Après abandon jusqu'au lendemain, on recueille le dépôt d'un joli bleu éclatant et qui se compose de feuillets cristallins, dont les formes, examinées au microscope, se trouvent être presque exclusivement rhomboïdales. On lave, à la trompe, 2 fois avec un peu d'eau, puis avec de l'alcool à 55 % et, bien rapidement (v. p. 176), avec de l'alcool absolu.

Séché à l'air, le sel contient 2 mol. d'eau de cristallisation; en cédant celles-ci, il change de couleur, prenant une belle teinte violette. Tous ces faits s'accordent parfaitement avec les indications de Willstätter¹⁾ et de E. Fischer²⁾. J'ai obtenu un rendement en sel cuivrique séché à l'air de 5^{gr},5; mais en concentrant l'eau-mère et la précipitant par l'alcool, j'ai pu en retirer encore 0^{gr},9 de sel de cuivre essentiellement analogue au produit principal, bien que renfermant une proportion insignifiante de sulfate de cuivre.

1^{gr},1869 de sel cuivrique séché à l'air, cédaient dans le vide à 70° pendant 24 heures 0^{gr},1302 (10,97 %). Abandonné au-dessus d'eau, le sel a réabsorbé 0^{gr},1313 et repris sa couleur bleue.

1^{gr},3042 de sel séché à l'air, ont perdu de la même manière 0^{gr},1431 (10,97 %).

0^{gr},1703 donnaient par le dosage de l'azote une quantité d'ammoniaque répondant à 14^{cc},53 d'hyposulfite (8,53 % d'azote).

0^{gr},2599 donnaient 0^{gr},0630 oxyde cuivrique correspondant à 19,37 % de cuivre.

0^{gr},5681 d'une préparation provenant d'un autre essai et qui furent placés dans le vide sulfurique, perdaient pendant 24 heures 0^{gr},0171, en prenant une coloration violette. Pendant un séjour prolongé dans le vide sulfurique, la perte va en augmentant, pour devenir constante au bout d'une semaine: 0^{gr},0622 (10,95 %). Abandonnée sur de l'eau, la matière en a réabsorbé en tout 0^{gr},0627.

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 33, 1164 (1900).

²⁾ Ibid. 34, 458 (1901).

0^{gr},2133 de cette dernière préparation donnaient une quantité d'ammoniaque répondant à 18^{cc},16 d'hyposulfite (8,51 % d'azote).

		Calculé	Trouvé			
C ₁₀	120,00	36,60				
H ₁₈	16,13	4,92				
O ₄	64,00	19,52				
N ₂	28,08	8,57	8,53			8,51
Cu	63,60	19,40	19,37			
2 H ₂ O	36,03	10,99	10,97	10,97	10,95	
(C ₈ H ₈ O ₂ N) ₂ Cu, 2 H ₂ O		327,84	100,00			

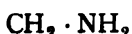
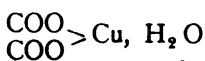
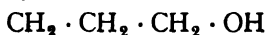
b. Préparation d'acide α -amino- δ -oxyvalérique pur du mélange de cet acide avec la glycocolle. Le mélange obtenu (B. v. p. 153) de l'oxyacide avec la glycocolle pesait, séché à l'air. 36^{gr},8. Un petit échantillon était soluble dans l'eau, la solution aqueuse présentait une réaction faiblement acide, renfermait une trace de chlore, et ne donnait pas de précipité avec l'acide phosphotungstique. Un dosage de l'azote en a donné 11,57 %, de sorte que la teneur totale en azote des 36^{gr},8 s'élevait à 4258 mgr.

36^{gr},5 de ce mélange ont été dissous au bain d'eau bouillante dans 600 + 50 + 50 + 50 cc. d'alcool à 80 %; il est resté 1 gr. env. à l'état non dissous et constitué principalement de glycocolle, la teneur en azote étant de 16,88 %.

Après dilution de la solution alcoolique avec de l'eau, j'ai distillé l'alcool dans le vide, étendu de nouveau avec de l'eau la solution aqueuse restante, puis soumis à un traitement, au bain-marie, par un excès de carbonate de cuivre (4 \times 10 gr.). La solution bleu foncé ainsi obtenue, fut filtrée et évaporée au bain-marie jusqu'à un volume de 200 à 250 cc., où la cristallisation commença déjà à chaud; le lendemain la masse entière avait pris une consistance de bouillie claire. Les cristaux furent recueillis, lavés, à la trompe, 2 fois avec de l'eau, puis avec de l'alcool à 55 %, et finalement à l'alcool absolu. Séchée à l'air, la poudre, d'un bleu violet et qui avait un bel éclat soyeux, pesait 23^{gr},1. Il résulta de l'analyse que le sel séché à l'air contenait une petite quantité d'eau (1,60 %), qui disparut entièrement par dessiccation dans le vide à 70° pendant 24 heures; le sel anhydre avait une teneur en azote de 8,69 %, c'est-à-dire très peu supérieure à la teneur théorique: 8,57 %.

Par évaporation des eaux mères et de lavage jusqu'à un volume d'environ 40 cc., réfrigération à l'eau glacée, filtration, lavage avec 3×25 cc. d'eau froide et recristallisation du sel cuivrique restant dans une portion d'eau aussi petite que possible, je pus obtenir encore 4^{gr},2 de sel cuivrique presque pur. (Séchée à l'air, la substance contenait 2,55 % d'eau, le sel anhydre renfermait 8,79 % d'azote.)

Quoique le sel cuivrique de l'acide aminooxyvalérique soit relativement peu soluble dans l'eau, il n'a pas été possible d'en obtenir directement à l'état de pureté plus de la quantité ci-dessus indiquée, parce que le sel cuivrique de la glycocolle s'unit à celui de l'oxyacide pour former un sel double très soluble. Ce sel double put être obtenu à l'état passablement pur par évaporation des eaux mères et de lavage jusqu'à un très petit volume (10—20 cc.), suivie d'une précipitation par un très grand excès d'alcool. Après deux ou trois heures de repos, le dépôt volumineux fut recueilli et lavé deux ou trois fois à l'alcool absolu. Séché à l'air, le dépôt pesait 13^{gr},5; il contenait 6,02 % d'eau, et à l'état anhydre 10,51 % d'azote, tandis que le sel double



doit contenir 6,26 % d'eau, et le sel déshydraté 10,41 % d'azote (voir en outre p. 166).

Il est à remarquer que d'autres expériences m'ont donné des sels dont les teneurs en eau et en azote s'écartent un peu plus de celles calculées pour ledit sel double; mais ces écarts peuvent aisément s'expliquer en admettant la présence d'un excès du sel de l'oxyacide ou de celui de la glycocolle; la teneur en eau a oscillé entre 5,53 % et 7,37 %, et la teneur en azote du sel anhydre entre 9,85 % et 10,55 %.

L'eau-mère alcoolique du sel double ci-dessus mentionné, présentait encore une couleur d'un bleu prononcé et renfermait plus de 300 mgr. d'azote, mais en même temps un peu de chlore, ainsi que, probablement, d'autres impuretés encore, et il était impossible d'en obtenir sans trop de peine des sels cuivriques

purs et surtout exempts de chlore. D'un autre côté, à partir du sel double indiqué plus haut, je pus assez facilement préparer le sel cuivrique de l'oxyacide à l'état presque pur; pour cela, il est préférable d'unir les sels doubles provenant de plusieurs essais, ce qui fournit aussi le meilleur rendement. Après avoir dissous le sel dans de l'eau, je l'ai privé de son cuivre au moyen de l'hydrogène sulfuré (v. p. 161) et traité le mélange obtenu d'équivalents presque égaux d'oxyacide et de glyocolle par l'alcool chaud à 80 %. La majeure partie de la glyocolle est restée à l'état non dissous, alors que la solution, après distillation de l'alcool et traitement par le carbonate de cuivre de la manière décrite plus haut, put fournir le sel cuivrique de l'acide oxyaminé à l'état presque parfaitement pur.

L'éther γ -bromopropyle-phtalimidomalonique, qui a servi de matière première, m'a donc fourni les produits suivants:

1° De l'acide pyrrolidine- α -carbonique (v. p. 155): environ 17 % de la quantité possible.

2° 26^{gr},8 de sel cuivrique déshydraté de l'oxyacide aminé: environ 57 % de la quantité possible.

3° Les 13^{gr},5 de sel double obtenus renferment à peu près la moitié (667 mgr.) de l'azote sous forme d'oxyacide, quantité d'azote qui, par rapport à celle de la matière première (4040 mgr.), monte à 16,5 % environ.

En tout, environ 90 %.

A l'effet d'une purification complète, j'ai soumis le sel cuivrique de l'oxyacide à une nouvelle cristallisation dans de l'eau. Une solution de 50 gr. de sel cuivrique dans environ 800 cc. d'eau chaude, à été filtrée pour la séparer d'une petite quantité d'un sel cuivrique bleu violet, à grains fins, presque insoluble dans l'eau même chaude; c'était vraisemblablement le sel cuivrique de l'acide α - ε -diaminopimélique (v. p. 144). Le liquide filtré, refroidi dans l'eau, fut laissé, en agitant à plusieurs reprises, jusqu'au lendemain; alors il s'était formé un abondant dépôt cristallin soyeux bleu violet et constitué apparemment par des lamelles; celles-ci, examinées au microscope, présentaient l'aspect de petits cristaux aciculaires, de forme irrégulière et souvent réunis en faisceaux et aggrégats. Ils ont été filtrés à la trompe, lavés une fois à l'eau froide, une fois à l'alcool à 55 %, finalement à l'alcool absolu, dans lequel le sel était tout à fait insoluble. Le rendement en sel séché à l'air était de 32^{gr},4 (Sel

cuivrique A_I). L'eau-mère put servir à y dissoudre de nouvelles quantités de sel cuivrique non recristallisé, ou bien, évaporée à concentration convenable, fournir encore du sel pur (sel cuivrique A_{II} : 8^{gr},4). Le sel cuivrique séché à l'air contenait toujours une petite quantité d'humidité (0,5—1,5 %), qui a disparu par dessiccation dans le vide à 70° pendant 24 heures; pour toutes les analyses ci-après j'ai employé une préparation ainsi séchée.

0^{gr},1556 de sel A_I ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 13^{cc},27 d'hyposulfite (8,53 % d'azote).

0^{gr},4855 de sel A_I ont donné 0^{gr},1174 d'oxyde de cuivre (19,32 % de cuivre).

0^{gr},2300 de sel A_I ont donné 0^{gr},3096 d'acide carbonique et 0^{gr},1256 d'eau (36,71 % de carbone et 6,11 % d'hydrogène).

0^{gr},2853 de sel A_{II} ont donné de l'ammoniaque correspondant à 24^{cc},45 d'hyposulfite (8,57 % d'azote).

0^{gr},3016 de sel B_I ont donné de l'ammoniaque correspondant à 25^{cc},87 d'hyposulfite (8,58 % d'azote).

0^{gr},1626 de sel B_I ont donné 0^{gr},0392 oxyde de cuivre (19,26 % de cuivre).

0^{gr},1796 de sel B_I ont donné 0^{gr},2404 d'acide carbonique et 0^{gr},0974 d'eau (36,51 % de carbone et 6,07 % d'hydrogène).

0^{gr},2660 de sel C_I ont donné de l'ammoniaque correspondant à 22^{cc},75 d'hyposulfite (8,55 % d'azote).

		Calculé	Trouvé			
C_{10}	120,00	36,60	36,71		36,51	
H_{20}	20,16	6,15	6,11		6,07	
O_8	96,00	29,28				
N_2	28,08	8,57	8,53	8,57	8,58	8,55
Cu	63,60	19,40	19,32		19,26	
<hr/>						
$(C_8 H_{10} O_3 N)_2 Cu$	327,84	100,00				

Dans le but de préparer l'oxyacide aminé comme tel, on a dissous 29 gr. de sel cuivrique pur dans 1 litre d'eau additionnée de 100 cc. d'acide sulfurique double-normal¹⁾. Le cuivre fut précipité par de l'hydrogène sulfuré. La précipitation achevée, on filtra, puis lava le sulfure cuivrique à l'eau aiguillée d'acide sulfurique et saturée d'hydrogène sulfuré. Ce dernier fut chassé du liquide filtré et de l'eau de lavage par chauffage et évaporation au bain-marie, et l'acide sulfurique fut éliminé au

¹⁾ Non additionnée d'acide sulfurique, le sulfure cuivrique traversait le filtre dans la filtration effectuée plus tard.

moyen d'un déficit aussi petit que possible de baryte. Après filtration, on concentra la solution dans le vide jusqu'à un petit volume, puis, ayant enlevé par filtration un peu de sulfate de baryte, on évapora au bain-marie dans une capsule, en agitant vers la fin jusqu'à ce que, même à chaud, le tout formât une bouillie. Laissée en repos sur de l'acide sulfurique jusqu'au lendemain, la matière, qui s'était alors prise entièrement en une masse cristalline, fut triturée à l'alcool absolu, filtrée à la trompe, et lavée à l'alcool absolu. Le rendement en oxyacide (A (non recristallisé)) était de $23^{\text{gr}},0$ (théorie: $23^{\text{gr}},6$). L'acide, séché à l'air, contenait environ $0,3\%$ d'humidité, qui fut enlevée par dessiccation dans le vide à 70° pendant 24 heures; il avait une faible couleur gris jaunâtre; à part cela, il était pur (voir le dosage de l'azote ci-dessous).

Pour le purifier complètement, j'ai fait recristalliser l'acide dans l'alcool à 80% . 20 gr. d'oxyacide ayant été dissous dans $500 + 100 + 50 + 50$ cc. de cet alcool, la solution fut filtrée à chaud, puis abandonnée à la cristallisation à la température ordinaire en 8 heures. L'acide oxyaminé s'est séparé sous forme de fins cristaux blancs, soyeux, apparemment lamellés; regardés au microscope, ils formaient des aggroupements de fins feuillets souvent terminés en pointe et presque aciculaires; souvent aussi, surtout parmi les cristaux formés les derniers et par conséquent le plus lentement, il se trouvait de longues aiguilles bien développées. Le précipité assez volumineux, filtré à la trompe, a été lavé une fois avec l'alcool à 80% et deux fois à l'alcool absolu. Rendement en acide pur séché à l'air (A): $14^{\text{gr}},7$. — Inutile d'ajouter que le reste de l'acide put être obtenu de l'eau-mère et de l'alcool de lavage, par distillation de l'alcool et évaporation du résidu jusqu'à siccité (v. p. 173). L'acide désigné ci-dessous comme C et obtenu par recristallisation de plusieurs de ces résidus réunis, est sous tous les rapports aussi pur que l'oxyacide A.

Les préparations d'oxyacide recristallisées contenaient constamment une trace d'eau ($0,07$ à $0,20\%$), qui pouvait être enlevée par dessiccation dans le vide à 70° pendant 24 heures; c'est de l'acide ainsi séché qui a servi pour toutes les analyses ci-dessous.

$0^{\text{gr}},2313$ d'oxyacide A (non recristallisé) ont donné une quantité d'ammoniaque répondant à $24^{\text{cc}},42$ d'hyposulfite ($10,56\%$ d'azote).

$0^{\text{gr}},2258$ d'oxyacide A ont donné de l'ammoniaque répondant à $23^{\text{cc}},75$ d'hyposulfite ($10,52\%$ d'azote).

0^{gr},2460 d'oxyacide A ont donné 0^{gr},4071 d'acide carbonique et 0^{gr},1865 d'eau (45,13 % de carbone et 8,48 % d'hydrogène).

0^{gr},2295 d'oxyacide B ont donné de l'ammoniaque répondant à 24^{cc},15 d'hyposulfite (10,52 % d'azote).

0^{gr},1991 d'oxyacide C ont donné de l'ammoniaque répondant à 20^{cc},95 d'hyposulfite (10,52 % d'azote).

0^{gr},1937 d'oxyacide D ont donné de l'ammoniaque répondant à 20^{cc},30 d'hyposulfite (10,48 % d'azote).

0^{gr},2543 d'oxyacide E ont donné de l'ammoniaque répondant à 26^{cc},75 d'hyposulfite (10,52 % d'azote).

0^{gr},1550 d'oxyacide F ont donné de l'ammoniaque répondant à 16^{cc},38 d'hyposulfite (10,57 % d'azote).

0^{gr},1776 d'oxyacide F ont donné 0^{gr},2923 d'acide carbonique et 0^{gr},1345 d'eau (44,89 % de carbone et 8,47 % d'hydrogène).

	Calculé			Trouvé					
C ₆	60,00	45,07		45,13					44,89
H ₁₁	11,09	8,33		8,48					8,47
O ₃	48,00	36,05							
N	14,04	10,55	10,56	10,52	10,52	10,52	10,48	10,52	10,57

C₆H₁₁O₃N 133,13 100,00

Soumis à un rapide chauffage dans des tubes capillaires au bain de glycérine jusqu'à 180° environ, puis à une élévation lente de température (à raison d'env. 10° par minute), la substance suinta à 217 à 218°, ne fondant complètement qu'à 223 à 224° (corr.), avec dégagement d'air et brunissement. Quand la température était maintenue à 208 à 210°, la substance fondait, en brunissant et se décomposant, au bout d'env. 5 minutes. L'oxyacide non recristallisé se comportait de la même manière; pourtant les fusion et décomposition complètes se produisaient déjà à 217 à 218° (corr.).

En chauffant pendant quelque temps (15 à 30 minutes) des quantités un peu plus grandes de l'oxyacide dans une étroite éprouvette fermée d'un bouchon et placée au bain d'huile à 195 à 200°, on voit des gouttes d'eau se déposer sur la partie supérieure de l'éprouvette, vraisemblablement avec transformation de l'oxyacide en acide pyrrolidine- α -carbonique. En même temps il s'est effectué des scissions plus profondes, avec dégagement d'ammoniaque ou d'autres vapeurs à réaction alcaline; la substance restante formait une masse résineuse brune.

L'oxyacide possède un goût doux. Il est très soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool absolu, même à chaud, un peu

plus soluble dans l'alcool méthylique et dans l'alcool éthylique aqueux, peu soluble dans l'acétone et dans l'éther acétique, très peu soluble, sinon tout à fait insoluble, dans l'éther, le chloroforme, le benzène et la ligroïne.

Quant à la manière dont se comporte cet oxyacide vis-à-vis de l'acide phosphotungstique, voir la troisième partie de ce mémoire, p. 168.

c. Préparation de la glyocolle à partir de mélanges de ce composé avec l'acide α -amino- δ -oxyvalérique. Il ressort de ce qui précède que la glyocolle est moins soluble dans l'alcool à 80 % que l'oxyacide, et par conséquent un traitement de mélanges tant soit peu riches en glyocolle par de l'alcool chaud de ladite concentration, fera dissoudre la presque totalité de l'oxyacide, mais seulement une partie de la glyocolle. J'ai tenté de diverses manières de faire recristalliser l'oxyacide dans les alcools méthylique ou éthylique de concentrations différentes, sans pouvoir jamais obtenir par cette voie un oxyacide parfaitement exempt de glyocolle; ce n'est qu'au moyen des sels cuivriques que j'ai pu y parvenir, ainsi que je l'ai exposé plus haut. Par contre, en partant de la partie qui avait résisté à l'alcool chaud à 80 %, j'ai pu préparer sans trop de difficulté de la glyocolle pure. Une simple dissolution dans l'eau, décoloration, s'il y a lieu, au moyen du noir animal, enfin précipitation de la solution convenablement concentrée par l'alcool à volume égal, suffisaient ordinairement à fournir de la glyocolle à peu près pure.

0^{gr},1193 de glyocolle ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 22^{cc},30 d'hyposulfite (18,69 % d'azote).

0^{gr},1680 de glyocolle ont donné 0^{gr},1950 d'acide carbonique et 0^{gr},1033 d'eau (31,66 % de carbone et 6,88 % d'hydrogène).

Avant d'avoir pu constater que la substance souillant l'oxyacide brut non encore purifié par le sel cuivrique, était de la glyocolle, je le prenais pour acide diaminopimélique (v. p. 144), et j'ai cherché alors à séparer l'un de l'autre les deux acides aminés par précipitation au moyen de l'acide phosphotungstique, que je croyais devoir précipiter l'acide diaminopimélique (la glyocolle). Or, j'ai réussi parfaitement bien, et je vais donner ici une courte description des conditions dans lesquelles ces précipitations ont lieu, supposant qu'il n'est pas généralement connu que la glyocolle peut être précipitée par l'acide phosphotung-

stique avec une telle facilité que je l'ai trouvé, même en l'absence de toute autre substance précipitable par ce réactif.

Environ 20 gr. du sel double très soluble ayant été dépourvus de cuivre de la manière décrite plus haut (v. p. 161), le mélange ainsi obtenu d'oxyacide et de glyocolle à molécules à peu près égales, fut précipité dans une solution assez concentrée et acidulée d'acide sulfurique (le volume était d'environ 100 cc.) par, en tout, environ 200 cc. d'une solution forte d'acide phosphotungstique (100 cc. contenaient 108 gr. d'acide cristallisé). Il se forma un dépôt abondant constitué, ainsi qu'un examen au microscope l'a fait montrer, par des cristaux aciculaires mélangés d'agréats de cristaux plutôt lamellés et qui, laissés en repos jusqu'au lendemain, se transformèrent en prismes de 4 pans. Après filtration à la trompe, on lava avec 3×25 cc. d'une solution d'acide phosphotungstique à 10 %.

Le poids du dépôt humide était d'environ 90 gr. Après dissolution dans $300 + 50 + 50$ cc. d'eau au bain-marie, j'en séparai par filtration une petite portion non dissoute et dont la structure était granuleuse. Ayant ajouté au filtrat 10 cc. d'acide phosphotungstique fort, puis refroidi et agité, on voit le sel phosphotungstique se précipiter de nouveau sous forme de jolis cristaux blancs qui, regardés au microscope, ont la forme de petits prismes assez minces ou plus souvent de tables à 4 pans et presque rectangulaires. Abandonné jusqu'au lendemain, le précipité fut filtré à la trompe et lavé trois fois à l'eau.

Le dépôt recristallisé (A), qui à l'état humide pesait 80 gr. environ, était constitué exclusivement de sel de glyocolle; car, dissous dans l'eau chaude et décomposé à l'hydroxyde de baryum de la façon habituelle, il fournissait 4^{gr},1 de glyocolle presque pure. (La teneur en azote était de 18,57 %).¹⁾

¹⁾ Les eaux-mères et les liquides de lavage de la précipitation et de la recristallisation du sel phosphotungstique de la glyocolle furent évaporés au bain-marie jusqu'à volume de 70—80 cc., puis refroidis, ce qui me donna un second dépôt (B) qui, recueilli et lavé 4 fois à l'eau glacée, puis décomposé par l'hydroxyde de baryum, fournit 3^{gr},8 d'une substance contenant environ 14% d'azote, correspondant à un mélange d'environ 40% de glyocolle et 60% d'oxyacide. Le filtrat de ce dépôt fournit, après traitement par de la baryte etc., 6^{gr},8 de substance (C) contenant 10,86% d'azote, de sorte que c'était de l'oxyacide à peu près pur. L'oxyacide faisant partie de la substance (B) fut extrait par ébullition avec de l'alcool à 80%. Après avoir additionné la solution ainsi obtenue de la substance (C), on chassa l'alcool et prépara de la façon habituelle le sel cuivrique de l'oxyacide; obtenu 6 gr. dudit sel à l'état de pureté approximative (8,67 % d'azote).

3 gr. de cette glycolle furent bouillis avec 100 cc. d'alcool à 80 %, ce qui ne fit entrer en dissolution qu'une partie fort minime. Je fis alors dissoudre le reste dans de l'eau et précipiter la solution par le double volume d'alcool, obtenant ainsi 2^{gr},3 de glycolle cristallisée d'une belle couleur blanche. Par dessiccation dans le vide à 70°, le poids ne diminua pas. Un chauffage jusqu'à 225 à 230° fit brunir la substance, elle fondit à 232 à 237° (corr.), et contenait 18,70 % d'azote.

0^{gr},0944 de glycolle ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 17^{cc},65 d'hyposulfite (18,70 % d'azote).

		Calculé	Trouvé	
C ₂	24,00	31,97	31,66	
H ₆	5,04	6,71	6,88	
O ₂	32,00	42,62		
N	14,04	18,70	18,69	18,70
<hr/> C ₂ H ₆ O ₂ N		75,08	100,00.	

Je vais décrire ici un certain nombre de petits essais faits par M. A. C. Andersen en vue d'éclaircir la solubilité dans l'eau des sels cuivriques de l'oxyacide et de la glycolle, soit à l'état pur, soit mélangés.

Dans ces essais nous avons fait usage d'un sel cuivrique pur de l'oxyacide, ainsi que d'un sel cuivrique de glycolle cristallisant en aiguilles et préparé à partir de la glycolle pure: $(\text{CH}_2 \cdot \text{NH}_2)_2 \text{Cu}, \text{H}_2\text{O}$. La teneur en eau de ce dernier sel était de 7,83 %, la teneur en azote du sel déshydraté: 13,10 %, en cuivre: 29,85 %, tandis que le calcul avait donné 7,84 % d'eau, 13,26 % d'azote et 30,04 % de cuivre.

Essai 1. On secoua $\frac{1}{800}$ molécule-gramme (0^{gr},77) du sel cuivrique de la glycolle pendant 4 heures avec 15 cc. d'eau dans une petite fiole. Après filtration (à la température de 20°), on dosa la teneur en azote dans 5 cc. du liquide filtré; trouvé 4^{mgr},29, d'où l'on peut calculer que 1 gr. du sel cuivrique hydraté exige environ 142 cc. d'eau pour se dissoudre à 20°. On secoua de nouveau le sel cuivrique non dissout pendant 4 heures avec 15 cc. d'eau; 5 cc. du filtrat (à 20°) contenaient également 4^{mgr},29 d'azote.

Essai 2. On traita $\frac{1}{800}$ molécule-gramme (1^{gr},09) du sel cuivrique de l'oxyacide de la même manière que le sel de la glycolle dans l'essai 1.

5 cc. du filtrat obtenu en premier lieu (temp. 20°) contenaient 4^{mgr},19 d'azote, 5 cc. du second filtrat (temp. 20°) contenaient 3^{mgr},79 d'azote, d'où il suit qu'il faut respectivement environ 102 et 113 cc. d'eau pour dissoudre 1 gr. du sel cuivrique de l'oxyacide.

Essai 3. 0^{gr},77 du sel de la glycolle + 1^{gr},09 de celui de l'oxyacide ont été traités de la même manière que dans les essais 1 et 2 avec 15 cc. d'eau, en tout. 5 cc. du liquide filtré (à 20°) obtenu en premier lieu, contenaient 16^{mgr},17 d'azote (traités séparément dans les essais 1 et 2 : 4^{mgr},29 + 4^{mgr},19 = 8^{mgr},48 d'azote); 5 cc. du second filtrat contenaient 15^{mgr},67 d'azote (essais 1 et 2 : 4^{mgr},29 + 3^{mgr},79 = 8^{mgr},08 d'azote).

Essai 4. On chauffa 0^{gr},77 du sel cuivrique de la glycolle avec 15 cc. d'eau dans une éprouvette pendant une demi-heure, avec dissolution presque totale; par refroidissement le tout se figea en une heure et prit la consistance d'une bouillie. 5 cc. du filtrat (à 17°) contenaient 4^{mgr},10 d'azote; par conséquent, 1 gr. du sel exige à cette température env. 149 cc. d'eau pour sa dissolution.

Essai 5. On traita 1^{gr},09 du sel cuivrique de l'oxyacide comme le sel de la glycolle dans l'essai 4 et il s'est comporté de la même manière que celui-ci. 5 cc. du liquide filtré (à 17°) contenaient 5^{mgr},30, d'où il suit qu'il faut environ 81 cc. d'eau pour dissoudre à cette température 1 gr. du sel en jeu.

Essai 6. On chauffa 0^{gr},77 du sel cuivrique de la glycolle et 1^{gr},09 de celui de l'oxyacide ensemble dans une éprouvette avec 15 cc. d'eau, ce qui fit dissoudre le tout en une demi-heure. Refroidi, le liquide resta limpide; ce n'est qu'après 4 heures de repos que l'on put constater un commencement de cristallisation. Après abandon jusqu'au lendemain, on trouva dans 5 cc. du liquide filtré 43^{mgr},70 d'azote (traité séparément dans les essais 4 et 5 : 4^{mgr},10 + 5^{mgr},30 = 9^{mgr},40 d'azote).

Pour le sel cuivrique de l'oxyacide les essais n'ont pas donné des résultats tout à fait concordants, probablement parce qu'il faut plus de temps que l'on n'en a employé dans les essais susmentionnés, tant pour produire une solution saturée du sel par agitation avec de l'eau à la température ambiante, que pour porter une solution sursaturée à séparer tout l'excédant du sel dissous. Toutefois il résulte évidemment de ces expériences, premièrement qu'à la température ambiante 1 gr. du sel cuiv-

rique de l'oxyacide demande pour sa dissolution 100 cc. environ d'eau, en second lieu que les sels cuivriques de l'oxyacide et de la glyocolle augmentent réciproquement et à un degré très considérable la solubilité l'un de l'autre dans l'eau, comme j'avais l'intention de le constater.

3. Transformation de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique en acide pyrrolidine- α -carbonique.

Avant d'exposer les essais que j'ai effectués en vue d'éclaircir les conditions dans lesquelles se fait la transformation de l'oxyacide aminé en acide pyrrolidinecarbonique, je vais décrire ici la méthode dont je me suis servi pour déceler et doser par approximation de petites quantités d'acide pyrrolidinecarbonique en présence de fortes proportions d'oxyacide. J'ai utilisé à cet effet la manière différente dont se comportent les deux acides vis-à-vis de l'alcool et vis-à-vis de l'acide phosphotungstique. Nous avons vu dans la partie précédente de ce mémoire (v. p. 153) que l'alcool absolu agissant sur un mélange des deux composés, en extrait la presque totalité de l'acide pyrrolidinecarbonique, tandis qu'il ne dissout que des quantités fort minimes de l'oxyacide.

Les essais ci-dessous mettent en évidence la manière dont les deux corps se comportent vis-à-vis d'une solution d'acide phosphotungstique (désignée ci-dessous comme »P-T«) dont la concentration était telle que 1 cc. correspondit à 10 mgr. d'azote.

No. 1. Une solution aqueuse à 5 % d'oxyacide pur (v. p. 173) additionnée de P-T, ne donna pas de dépôt: 0^{gr},2 d'oxyacide pur pouvaient même être dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T (c'est-à-dire un peu plus de P-T que la proportion correspondant à l'azote). Même après plusieurs heures de repos, interrompu par des agitations fréquentes, le liquide conservait sa limpidité; mais laissé jusqu'au lendemain, il montrait presque toujours un commencement de cristallisation, qui par frottement allait en augmentant. Un examen microscopique révéla que le dépôt qui s'était formé était constitué exclusivement par des cristaux aciculaires qui, lorsque la cristallisation s'opérait au repos, prenaient l'aspect de faisceaux d'aiguilles assez épaisses. Ce dépôt, une fois formé, était assez peu soluble dans l'eau, mais très soluble dans l'alcool.

No. 2. Une solution de 0^{gr},05 d'acide pyrrolidinecarbonique

pur (contenant 1 molécule d'eau) dans 10 cc. d'eau, additionnée de 1 cc. P-T et frottée avec une spatule, ne tarda pas à séparer un précipité blanc composé, ainsi que le montra l'examen microscopique, exclusivement de prismes courts et épais, quadrilatères ou hectoédriques, rappelant souvent les cristaux de spath calcaire (désigné ci-dessous comme »caractéristique«).

No. 3. Une solution de $0^{\text{gr}},025$ d'acide pyrrolidinecarbonique pur dans 10 cc. d'eau, additionnée de $\frac{1}{2}$ cc. de P-T, ne donna pas de dépôt au bout d'une heure; mais l'abandon jusqu'au lendemain produisit un dépôt assez abondant et possédant l'aspect caractéristique.

En présence de l'oxyacide, la réaction n'est pas tout à fait aussi nette, et il faut ajouter une quantité de P-T suffisante pour convertir en sel phosphotungstique la plus grande partie de l'oxyacide; sans cela, l'acide pyrrolidinecarbonique ne se précipite pas, à moins qu'il n'y soit en proportion abondante.

No. 4. Une solution de $0^{\text{gr}},1$ d'oxyacide + $0^{\text{gr}},05$ d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau additionnée de 1 cc. de P-T, ne donna pas de dépôt en une heure; par contre, avec 2 cc. de P-T, il se produisit en beaucoup moins de temps un abondant dépôt caractéristique.

No. 5. Une solution de $0^{\text{gr}},1$ d'oxyacide + $0^{\text{gr}},025$ d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau, ne donna qu'après repos jusqu'au lendemain avec 2 cc. de P-T un assez abondant dépôt caractéristique.

No. 6. Une solution de $0^{\text{gr}},2$ d'oxyacide + $0^{\text{gr}},05$ d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau, ne donna avec 3 cc. de P-T un dépôt caractéristique qu'au bout de 12 heures de repos.

No. 7. Une solution de $0^{\text{gr}},2$ d'oxyacide + $0^{\text{gr}},075$ d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau donna, avec 3 cc. de P-T, au bout d'une demi-heure un abondant dépôt caractéristique.

No. 8. Une solution de $0^{\text{gr}},2$ d'oxyacide + $0^{\text{gr}},1$ d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau, dans laquelle on fit tomber 1 cc. de P-T, fournit un dépôt à l'endroit où tomba la goutte; mais quand on secoua, ce dépôt rentra en dissolution et, en dépit d'agitation constante, une heure se passa avant que la cristallisation commençât; des gouttes ultérieures de P-T produisirent tout de suite un abondant précipité caractéristique. On put reconnaître que 2 cc. de P-T avaient précipité la presque totalité de l'acide

pyrrolidinecarbonique; car après abandon jusqu'au lendemain, suivi d'une filtration et d'une addition d'encore 1 cc. de P-T, on ne put constater, au bout de 8 heures, qu'un dépôt insignifiant.

No. 9. Une solution de 0^{gr},2 d'oxyacide + 0^{gr},25 d'acide pyrrolidinecarbonique dans 10 cc. d'eau, à laquelle on ajouta, goutte à goutte, 1 cc. de P-T, fournit un dépôt là où tombait la goutte; mais l'agitation de la solution fit redissoudre ce dépôt, et quand on ajoutait encore des gouttes de P-T, le dépôt ne se redissolvait que partiellement, et le reste s'est déposé à l'état huileux. Cependant l'huile ne fut que quelques secondes avant de se cristalliser, après quoi le dépôt se précipita aussitôt à l'état cristallin et possédant l'aspect caractéristique. 4 cc. de P-T purent précipiter la totalité de l'acide pyrrolidinecarbonique, tandis que 3 cc. n'y suffisaient pas.

No. 10. Une solution aqueuse de 3 gr. d'oxyacide ayant été évaporée à siccité, le résidu fut traité par l'alcool, d'abord à froid, puis à chaud et sur le filtre. Le reste non dissous dans l'alcool pesait 2^{gr},9. Le résidu d'évaporation de la solution alcoolique pesait 0^{gr},07. Dissous dans 10 cc. d'eau, il ne donna de dépôt ni par addition de 1 cc., ni par celle de 2 cc. de P-T, même pas après plusieurs jours de repos.

No. 11. 3 gr. d'oxyacide + 0^{gr},025 d'acide pyrrolidinecarbonique furent soumis au même traitement que je viens de décrire. Le résidu non dissous dans l'alcool pesait 2^{gr},9. Le résidu d'évaporation de l'extraction alcoolique pesait 0^{gr},1. Dissous dans 10 cc. d'eau et additionné de 2 cc. de P-T, puis laissé en repos jusqu'au lendemain, il fournit un joli dépôt du sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique et qui montrait l'aspect caractéristique.

En me basant sur ces essais, je me suis servi du procédé suivant pour rechercher et doser approximativement de petites quantités d'acide pyrrolidinecarbonique existant à côté de fortes proportions d'oxyacide: Après avoir débarrassé de matières étrangères (acides chlorhydrique et sulfurique, hydroxyde de baryum, etc.) le mélange d'oxyacide et d'acide pyrrolidinecarbonique, on a évaporé à consistance de bouillie claire la solution des deux acides. Le reste, solidifié par refroidissement, fut bien trituré à l'alcool absolu, puis filtré, après quoi on a lavé le résidu trois fois à l'alcool absolu chaud. Le reste non dissous fut pesé et considéré comme de l'oxyacide, et la solution alcoolique fut diluée

avec de l'eau, puis évaporée à sec dans une capsule tarée à l'avance. On pèse le résidu, puis le dissout dans 10 cc. d'eau. En agitant constamment la solution, on y fait tomber 1 cc. de P-T, ce qui, en présence d'acide pyrrolidinecarbonique, donne toujours naissance à un précipité huileux qui, par suite des impuretés qu'il contient, est toujours plus ou moins foncé et qui, agité, ne peut pas entrer en dissolution, ce qu'il peut par contre quand on met en œuvre des substances pures. Remué, le dépôt huileux forme une masse visqueuse qui, abandonnée et additionnée d'un peu plus de P-T, ne tarde pas à devenir cristalline. Le liquide surnageant étant devenu limpide, on y fait tomber avec précaution une goutte de P-T, afin de voir si la précipitation continue; dans ce cas on verse encore 1 cc. de P-T dans la solution, et le précipité ainsi formé est alors ordinairement cristallin. On continue de cette manière jusqu'à ce que l'addition d'une goutte de P-T ne donne plus de précipité tout de suite. Alors on laisse reposer le tout pendant une heure, en agitant fréquemment; puis on filtre et additionne le liquide filtré de 1 cc. de P-T. Si alors dans le courant d'une heure il se forme un dépôt caractéristique et bien net du sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique, on filtre de nouveau et ajoute encore 1 cc. de P-T, et ainsi de suite, jusqu'à ce qu'une nouvelle addition de P-T ne provoque plus la formation du dépôt caractéristique (constitué de cristaux prismatiques courts et épais, voir p. 169). On peut alors considérer comme précipité la totalité de l'acide pyrrolidinecarbonique, et l'on peut juger de la quantité de celui-ci par la dose de P-T exigée pour la précipitation complète, en ne comprenant pas dans le compte le centimètre cube ajouté en dernier lieu, et qui n'a pas donné de précipité, et en défalquant toujours 1 cc. de P-T, qui peut être regardé comme correspondant à la proportion peu considérable d'oxyacide.

J'ai toujours examiné bien exactement au microscope l'aspect des précipités, et n'y ai jamais rencontré de cristaux aciculaires (sel phosphotungstique de l'oxyacide, voir p. 168); d'un autre côté, il a pu arriver que le précipité n'a pas présenté l'aspect caractéristique décrit plus haut. J'ai alors tenté de faire recristalliser le précipité dans de l'eau, mais en opérant ainsi je n'ai jamais réussi à produire les cristaux, faciles à reconnaître, du sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique, composé qui à l'état pur se recristallise aisément. Par conséquent, dans tous

les cas où le précipité n'offrait pas l'aspect caractéristique¹⁾, comme aussi dans ceux où, même après abandon jusqu'au lendemain, aucun dépôt n'avait pris naissance, j'ai considéré l'oxyacide en question comme exempt d'acide pyrrolidinecarbonique ou, plus exactement, comme renfermant moins de 25 mgr. environ de cet acide (comp. essai no. 11, p. 170).

Les recherches que je vais exposer et que j'ai faites à l'occasion de la recristallisation de l'oxyacide, démontreront, je crois, que l'oxyacide employé dans les essais ci-dessus était bien exempt d'acide pyrrolidinecarbonique.

La différence entre la teneur en azote de l'oxyacide et celle de l'acide pyrrolidinecarbonique déshydraté, est inférieure à 2 %. La différence entre les teneurs en carbone atteint à peu près 7 %. En conséquence, une analyse élémentaire ne saurait déceler une proportion inférieure à 2 ou 3 % d'acide pyrrolidinecarbonique dans l'oxyacide, et dans un dosage d'azote le pourcentage décelable de ladite impureté est plutôt moindre encore. L'épreuve qualitative mentionnée précédemment (v. p. 168) et d'après laquelle 0^{gr},2 d'oxyacide doivent se dissoudre à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T, n'est pas non plus assez sensible pour déceler des quantités minimales d'acide pyrrolidinecarbonique; mais, d'un autre côté, elle est excellente quand il s'agit de prouver par tâtonnements la présence dans l'oxyacide non seulement d'acide pyrrolidinecarbonique, mais encore de glycocolle (comp. p. 165). En revanche, l'autre méthode décrite plus haut est beaucoup plus précise: elle permet même d'établir l'existence de moins de 1 % d'acide pyrrolidinecarbonique dans l'oxyacide (p. 170, essais nos 10 et 11). Il est évident que l'application de cette épreuve, jointe à la recristallisation de quantités considérables d'oxyacide, permettra de révéler la présence d'une teneur encore moindre en acide pyrrolidinecarbonique, étant donné que celui-ci, qui peut être extrait même par l'alcool absolu, restera dans l'eau-mère lorsqu'on fait recristalliser l'oxyacide dans l'alcool à 80 %. La recristallisation de 20 gr. d'oxyacide obtenu par le procédé décrit précédemment, c'est-à-dire au moyen de sel cuivrique recristallisé (v. p. 161), a alors produit en premier lieu 14^{gr},7 d'oxyacide recristallisé (v. p. 162). En chassant l'alcool de l'eau-mère

¹⁾ Ces cas ne se produisaient que lorsque la quantité de P-T mise en œuvre était fort peu considérable, et même alors ils étaient assez rares.

dans le vide, dissolvant le résidu dans de l'eau, évaporant la solution au bain-marie jusqu'à consistance de bouillie, triturant et lavant cette masse à l'alcool absolu, d'abord à froid, puis à chaud, on put obtenir encore 5 gr. d'oxyacide, tandis qu'évaporés à siccité, les extraits alcooliques laissaient un résidu pesant 0^{gr},2 et dans lequel on pouvait bien, à l'aide de P-T, reconnaître l'existence d'acide pyrrolidinecarbonique, mais en proportions tellement minimes que sa teneur en azote n'a pu atteindre que quelques peu milligrammes. J'ai eu un résultat tout à fait analogue en faisant recristalliser 20^{gr},8 d'oxyacide (récupérés pour la majeure partie dans les essais faits en vue de convertir l'oxyacide, en acide pyrrolidinecarbonique en traitant par un acide, par éthérification etc.): le rendement était de 14^{gr},8 + 5^{gr},6 d'oxyacide, et la solution alcoolique fournissait un résidu pesant 0^{gr},23 et renfermant une trace d'acide pyrrolidinecarbonique. En faisant observer que seul l'acide oxyaminé recristallisé (c'est-à-dire, dans les deux essais ci-dessus indiqués, respectivement les 14^{gr},7 et les 14^{gr},8) a servi tant pour les recherches exposées au début de ce chapitre que pour les essais décrits ci-après de transformation de l'oxyacide en acide pyrrolidinecarbonique, je crois être en droit de tirer cette conclusion qu'on peut regarder ledit oxyacide recristallisé comme exempt d'acide pyrrolidinecarbonique.

a. Traitement de l'oxyacide par l'acide chlorhydrique ou par l'hydroxyde de baryum.

Essai n° 1. Une solution de 3 gr. d'oxyacide dans 200 cc. d'acide chlorhydrique 5-normal, fut évaporée au bain-marie en 3 heures. Puis j'y ai ajouté de nouveau 200 cc. d'acide chlorhydrique 5-normal et évaporé encore. Finalement, cette opération a été répétée pour la troisième fois. Déjà après la première évaporation en présence d'acide chlorhydrique, un petit échantillon prélevé et dilué d'un peu d'eau, a donné avec P-T un précipité abondant.

Le résidu d'évaporation dissous dans de l'eau, fut débarrassé d'acide chlorhydrique au moyen de carbonate d'argent, et la solution privée d'argent et renfermant une proportion fort minime d'acide chlorhydrique, fut évaporée et soumise au traitement décrit à la p. 170.

2^{gr},6 d'oxyacide restèrent indissous dans l'alcool (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T). La solution

alcoolique laissa un résidu du poids de 0^{gr},3; la quantité d'acide pyrrolidinecarbonique y contenue répondait à environ 2 cc. de P-T ou à environ 20 mgr. d'azote (le 3^{ième} cc. de P-T donna encore du dépôt, le 4^{ième} non (v. p. 171).

Il ressort donc que dans cet essai environ 6% de la quantité d'oxyacide se sont convertis en acide pyrrolidinecarbonique.

Essai n° 2. 3 gr. d'oxyacide furent traités comme je viens de l'indiquer, à cette différence près que l'acide chlorhydrique 5-normal a été remplacé par la même quantité d'acide chlorhydrique concentré.

2^{gr},3 d'oxyacide restèrent indissous dans l'alcool absolu (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T) La solution alcoolique laissa un résidu du poids de 0^{gr},5; la quantité d'acide pyrrolidinecarbonique y contenue, répondait à environ 4 cc. de P-T ou à 40 mgr. environ d'azote.

Il ressort donc que dans cet essai environ 13% de la quantité d'oxyacide se sont convertis en acide pyrrolidinecarbonique.

Essai n° 3. 3 gr. d'oxyacide furent dissous dans 200 cc. d'acide chlorhydrique concentré, qui se trouvaient dans un ballon de $\frac{3}{4}$ l. Puis, on a chauffé pendant 3 heures dans le bain d'huile, dont la température s'éleva graduellement jusqu'à 150°. Après évaporation dans une capsule au bain-marie, le résidu fut repris par 100 cc. d'acide chlorhydrique concentré, et la solution fut de nouveau évaporée au bain-marie. Ces opérations terminées, on soumit au même traitement que dans l'essai n° 1.

1^{gr},75 d'oxyacide restèrent indissous dans l'alcool absolu (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T). La solution alcoolique laissa un résidu du poids de 1^{gr},1; la quantité d'acide pyrrolidinecarbonique y contenue répondait à environ 10 cc. de P-T, soit à 100 mgr. environ d'azote.

Il ressort donc que dans cet essai 32% environ de l'oxyacide se sont convertis en acide pyrrolidinecarbonique.

Quand on chauffe l'oxyacide en présence d'acides chlorhydrique ou sulfurique fort étendus, il ne se forme pas d'acide pyrrolidinecarbonique (voir les essais nos 7 et 8, p. 180).

Essai n° 4. On traita 3 gr. d'oxyacide dans un ballon de 1 l., renfermant 40 gr. d'hydroxyde de baryum cristallisé et 100 cc.

d'eau, en chauffant au bain-marie pendant 32 heures. Après avoir ajouté encore 20 gr. de baryte et 50 cc. d'eau, et après un chauffage ultérieur durant 32 heures, j'ai éliminé tout le baryum avec un excès aussi petit que possible d'acide sulfurique. Finalement, le filtrat du sulfate de baryum a été évaporé et traité comme à l'ordinaire.

2^{gr},7 d'oxyacide restèrent indissous dans l'alcool absolu (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T); la solution alcoolique laissa un résidu qui pesait 0^{gr},3 et qui, dissous à l'eau, ne donna pas de précipité avec P-T, de sorte que dans cet essai il ne s'est pas formé d'acide pyrrolidine-carbonique. L'action de l'hydroxyde de baryum sur l'oxyacide n'a pas non plus fait perdre des quantités notables d'azote, car la solution aqueuse des 0^{gr},3 contenaient environ 28 mgr. d'azote ($3 \text{ gr.} \div 2^{\text{gr}},7 = 0^{\text{gr}},3$ d'oxyacide contiennent 31^{mgr},65 d'azote).

Le sel phosphotungstique, obtenu dans les essais nos 1, 2 et 3, de l'acide pyrrolidinecarbonique, fut rassemblé, puis lavé à l'eau froide. Ensuite, j'ai éliminé l'acide phosphotungstique et précipité encore une fois l'acide pyrrolidinecarbonique à l'état de sel phosphotungstique. Cela fait, l'acide pyrrolidinecarbonique obtenu à partir de ce dernier précipité, fut transformé en sel cuivrique. (Pour le mode opération, voir p. 154 et 157). J'ai obtenu 1^{gr},0 de sel cuivrique cristallisant comme auparavant en belles tables rhomboïdales caractéristiques, et qui cependant, soumis au lavage à l'alcool absolu, demeura assez longtemps en contact avec celui-ci et, par suite, céda un peu de son eau de cristallisation¹⁾, en changeant de couleur. L'eau-mère a fourni encore 0^{gr},2 de sel cuivrique presque pur, mêlé seulement à un peu de sulfate de cuivre.

0^{gr},9544 de sel cuivrique séché à l'air, furent placés dans le vide à 70°, et abandonnèrent en 48 heures seulement 0^{gr},0814 (8,53 %), alors que le sel cuivrique hydraté doit contenir 10,99 % d'eau. J'ai donc exposé le reste sec, pesant 0^{gr},8730, au-dessus d'eau pendant 48 heures, puis à l'air, jusqu'à poids constant. Il avait alors absorbé 0^{gr},1077 d'eau, correspondant à 10,98 % du poids du sel hydraté ($0^{\text{gr}},9807 = 0^{\text{gr}},8730 + 0^{\text{gr}},1077$).

0^{gr},2295 de ce dernier sel ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 19^{cc},55 d'hyposulfite (8,52 % d'azote, calculé: 8,57 %).

¹⁾ Ceci expliquera peut-être la teneur peu élevée en eau (9.79 %) d'un sel cuivrique, pur à part cette eau, préparé par E. Fischer (Zeitsch. physiol. Ch. 33, 413 [1901]) au moyen de l'acide pyrrolidine- α -carbonique racémique, qu'il avait obtenu par scission d'albumine d'oeuf.

Le petit essai ci-après démontre que, traité par l'alcool absolu, un sel cuivrique de composition tout à fait normale cède des quantités notables d'eau. Sur 1 gr. du sel cuivrique mentionné plus haut (v. p. 157) de l'acide pyrrolidinecarbonique (contenant 10,95 % d'eau et 8,51 % d'azote) et que j'avais placé dans une petite capsule, j'ai versé 25 cc. d'alcool absolu. Après avoir agité quelques minutes, il se produisit un changement de couleur bien prononcé: du bleu pur au violet de plus en plus foncé. Ayant agité fréquemment pendant une demi-heure, on filtra, et le sel fut lavé une fois à l'alcool absolu, puis à l'éther; finalement il subit une dessiccation rapide à l'air. A la suite de ce traitement, le poids était d'environ 0^{gr},9. J'ai trouvé une teneur en azote du sel anhydre de 9,22 % et, par conséquent, il n'y a pas eu déshydratation complète (le calcul avait donné une teneur en azote du sel anhydre de 9,62 %). Aussi, placé au-dessus d'eau, puis exposé à l'air jusqu'à poids constant, le sel a-t-il absorbé de nouveau 8,66 % d'eau, ce qui donne une teneur en azote du sel hydraté de

$$\frac{9,22 \times 100}{108,66} = 8,49 \text{ (la substance initiale contenait 8,51 \% d'azote.)}$$

b. Dédoublément du produit de benzylation de l'oxyacide à l'aide des acides chlorhydrique ou sulfurique. Si l'on prend à tâche de rechercher l'acide α -amino- δ -oxyvalérique ou des oxyacides aminés semblables dans un mélange de divers acides aminés, formé dans une scission ordinaire de matière protéique, on se trouve actuellement assez embarrassé. Comme on l'a dit dans l'introduction, il est vrai qu'on a réussi, à l'aide de la « méthode par éthérification » de E. Fischer, à isoler la sérine des produits de décomposition d'une grande série de protéines; mais déjà la sérine, terme le plus bas du groupe des acides oxyaminés, se trouve dans les fractions bouillant à la température la plus élevée des éthers-sels des acides aminés et, par conséquent, il est fort probable que les éthers-sels des termes plus élevés de la série des oxyacides aminés ne se laissent distiller que très difficilement; l'essai décrit dans la dernière partie du présent chapitre (v. p. 181) confirme cela en ce qui concerne l'acide α -amino- δ -oxyvalérique.

On est alors tenté d'essayer l'isolation des acides oxyaminés à l'aide de produits de substitution convenables, qui pourraient à leur tour fournir les acides eux-mêmes.

C'est pourquoi j'ai pensé qu'il y aurait intérêt à apprendre à connaître les propriétés du produit benzoylé de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique, et surtout à essayer s'il y avait possibilité, par scission au moyen d'acides très étendus, de regagner l'oxyacide sans qu'il se produise en même temps des quantités trop importantes d'acide pyrrolidine- α -carbonique.

$\frac{1}{30}$ molécule-gramme d'oxyacide ($6^{\text{gr}},66$) a été benzoylé en réfrigérant constamment à la glace et secouant à peu près comme cela a été indiqué pour l'acide α - δ -diaminovalérique¹⁾, avec le triple de la quantité calculée de chlorure de benzoyle ajouté par 10 portion égales. En même temps on a ajouté une solution d'hydroxyde de baryum de manière que la réaction fût toujours nettement alcaline (quantités totales employées: 21 gr. de chlorure de benzoyle et 800 cc. d'eau de baryte saturée à froid). Après repos jusqu'au lendemain, on a séparé par filtration une petite quantité d'une impureté huileuse (contenant un total de 38 mgr. d'azote), après quoi le liquide filtré alcalin a été refroidi à la glace et précipité par 50 cc. d'acide chlorhydrique 5-normal. L'acide benzoïque ainsi précipité pesait à l'état lavé et séché à l'air $9^{\text{gr}},9$ et renfermait, en tout, seulement 6 mgr. d'azote. Le reste de l'acide benzoïque libre a été extrait de la solution en la secouant avec de l'éther. On a obtenu ainsi $3^{\text{gr}},05$ d'acide benzoïque renfermant, en tout, 45 mgr. d'azote et qui, partant, n'était pas pur; en traitant ces 3 gr. d'acide benzoïque impur par de petites doses successives d'éther, on a pu extraire l'acide benzoïque, et il restait une masse huileuse incristallisable et formée vraisemblablement du dérivé benzoylé de l'oxyacide.

La solution dépourvue d'acide benzoïque libre, fut rendue très faiblement alcaline à l'aide d'eau de baryte, puis évaporée au bain-marie jusqu'à consistance de bouillie claire. Cette masse refroidie à la glace et triturée avec un pistille, fut traitée par environ 20 fois son volume d'alcool absolu. Après 3 heures de séjour dans de l'eau glacée, le chlorure de baryum ($47^{\text{gr}},2$ avec, en tout, 5 mgr. d'azote) est séparé par filtration, puis soigneusement lavé à l'alcool absolu. On distille l'alcool de la solution alcoolique dans le vide, dissout le résidu dans de l'eau et évapore la solution aqueuse au bain-marie jusqu'à consistance sirupeuse. Refroidie dans l'eau glacée, la masse devient pâteuse, sans toute-

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 45 (1902).

fois se cristalliser nettement. Délayée dans de l'alcool, la masse sirupeuse se dissout facilement, bien qu'un peu lentement (employé 100 + 50 cc. d'alcool absolu); il reste un peu de chlorure de baryum qui, lavé à l'alcool absolu et séché à l'air, accuse un poids de 0^{gr},75 et renferme en tout 2 mgr. d'azote.

On verra plus loin que la solution alcoolique renferme le sel de baryum de l'acide α -benzoylamino- δ -oxyvalérique, sel qui, par conséquent, n'a été obtenu ici que sous forme d'une masse sirupeuse soluble dans l'alcool absolu. La solution contenait en tout 594 mgr. d'azote; comprenant dans le compte les teneurs en azote des précipités mentionnés précédemment ($38 + 6 + 45 + 5 + 2 = 96$ mgr.), nous arrivons à une teneur totale en azote de 690 mgr. (La matière première en contenait $\frac{1}{30} \times 14040 = 702$ mgr.).

A l'aide d'une portion minime de sulfate d'argent et d'une quantité convenable d'acide sulfurique étendu, la solution alcoolique du sel de baryum fut dépourvue de la majeure partie de son chlore et de tout son baryum, de sorte que, outre l'acide α -benzoylamino- δ -oxyvalérique libre, la solution ne renfermait plus qu'une trace d'acide chlorhydrique et d'acide sulfurique. Après dosage de l'azote dans une prise de la solution, on en mesura 2 portions (celles employées dans les essais nos 5 et 6 ci-dessous) contenant chacune 264 mgr. d'azote, correspondant à 2^{gr},5 d'oxyacide; la proportion correspondante de la combinaison benzoylée doit fournir par dédoublement 2^{gr},3 d'acide benzoïque.

L'alcool des deux solutions mesurées fut distillé, sous pression réduite, dans des ballons de la capacité de 1 l., et les résidus huileux, constitués par de l'acide α -benzoylamino- δ -oxyvalérique, furent traités au bain d'eau bouillante respectivement par 50 cc. d'acide chlorhydrique normal (essai n° 5) et par 50 cc. d'acide sulfurique normal (essai n° 6). En même temps et dans des conditions tout à fait analogues, 2^{gr},5 d'oxyacide non benzoylé furent chauffés en présence de 50 cc. d'acide chlorhydrique normal (essai n° 7) ou de 50 cc. d'acide sulfurique normal (essai n° 8). La durée du chauffage était de 8 heures chaque fois. Ensuite, l'acide benzoïque mis en liberté dans les essais nos 5 et 6 fut extrait à l'aide d'éther, et les extraits étherés furent lavés en secouant avec 2×10 cc. d'acide normal respectivement chlorhydrique et sulfurique, puis évaporés à siccité dans une capsule pesée d'avance, la chaleur étant aussi faible que possible. L'acide chlorhydrique

ou sulfurique ayant servi au lavage de l'éther, fut ajouté à la solution principale (resp. l'essai n° 5 et l'essai n° 6), et en même temps on ajouta une quantité correspondante d'acide chlorhydrique ou sulfurique aux deux portions d'oxyacide non benzoylé (essais n° 7 et 8), puis on chauffa de nouveau pendant 8 heures, et ainsi de suite, jusqu'à ce que, dans les essais sur l'oxyacide benzoylé, le liquide après un chauffage renouvelé ne cédât plus d'acide benzoïque à l'éther. On a constamment contrôlé le volume du liquide, de même qu'en ajoutant de temps en temps un peu d'eau, on a pris soin que la concentration de l'acide variât aussi peu que possible. Finalement, l'acide chlorhydrique ou sulfurique ayant été précipité de la manière habituelle, on évapora la solution à sec, et rechercha par la méthode précédemment décrite, si le résidu contenait de l'acide pyrrolidine-carbonique (voir p. 170).

Comme on devait s'y attendre, l'action dédoublante de l'acide chlorhydrique normal fut plus rapide que celle de l'acide sulfurique. En effet, après 8 heures de chauffage en présence de l'acide chlorhydrique, toute l'huile avait disparu, alors que dans le cas de l'acide sulfurique il se passait 2×8 heures (comparez aussi les quantités d'acide benzoïque extraites).

Essai n° 5. Le dérivé benzoylé de $2^{gr},5$ d'oxyacide fut soumis pendant 6×8 heures à l'action de la chaleur en présence d'acide chlorhydrique normal. L'acide benzoïque obtenu pesait: $1,30 + 0,45 + 0,25 + 0,15 + 0,08 + 0,02 = 2^{gr},25$ (calculé: $2^{gr},3$). Pendant l'évaporation de la solution privée de son acide chlorhydrique, l'odeur caractéristique de pyrrolidine se faisait sentir très nettement. Poids du résidu d'évaporation $2^{gr},44$, dont par le traitement à l'alcool absolu $2^{gr},26$ d'oxyacide sont restés indissous ($0^{gr},2$ de l'oxyacide se sont dissous à limpide complète dans $2^{cc},5$ de P-T). La solution alcoolique laissa un résidu pesant $0^{gr},17$ et qui, traité par 1 cc. de P-T, donna un abondant précipité huileux sans les cristaux caractéristiques du sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique; en additionnant de nouveau de P-T, on n'obtint plus de précipité, d'où il faut conclure à la présence d'une trace seulement d'acide pyrrolidine-carbonique.

Essai n° 6. Le dérivé benzoylé de $2^{gr},5$ d'oxyacide fut chauffé pendant 7×8 heures en présence d'acide sulfurique normal. L'acide benzoïque obtenu pesait: $0,75 + 0,50 + 0,40 +$

$0,30 + 0,23 + 0,10 + 0,04 = 2^{\text{gr}},32$. Pendant l'évaporation de la solution débarrassée d'acide sulfurique, on percevait une forte odeur de pyrrolidine. Le résidu d'évaporation pesait $2^{\text{gr}},40$. Insolubles dans l'alcool absolu restaient $2^{\text{gr}},10$ d'oxyacide ($0^{\text{gr}},2$ se sont dissous à limpidité complète dans $2^{\text{cc}},5$ de P-T). La solution alcoolique laissa un reste pesant $0^{\text{gr}},28$ et qui se comportait tout à fait comme celui de l'essai n° 5.

Essai n° 7. $2^{\text{gr}},5$ d'oxyacide furent chauffés pendant, en tout, 6×8 heures avec de l'acide chlorhydrique normal. Pendant l'évaporation de la solution débarrassée d'acide chlorhydrique, l'odeur de pyrrolidine ne se faisait pas sentir. Le résidu d'évaporation pesait $2^{\text{gr}},45$, dont le traitement par l'alcool absolu a laissé indissous $2^{\text{gr}},35$ d'oxyacide ($0^{\text{gr}},2$ se sont dissous à limpidité complète dans $2^{\text{cc}},5$ de P-T). La solution alcoolique laissa un reste pesant $0^{\text{gr}},1$ et qui, traité par P-T, donna un précipité fort minime sans cristaux de sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique.

Essai n° 8. $2^{\text{gr}},5$ d'oxyacide furent soumis pendant 7×8 heures à l'action de la chaleur en présence d'acide sulfurique normal. Pendant l'évaporation de la solution privée de son acide sulfurique l'odeur de pyrrolidine ne se faisait pas sentir. Le reste d'évaporation pesait $2^{\text{gr}},50$. Insoluble dans l'alcool absolu étaient $2^{\text{gr}},45$ d'oxyacide ($0^{\text{gr}},2$ se sont dissous à limpidité complète dans $2^{\text{cc}},5$ de P-T). La solution alcoolique laissa un résidu pesant $0^{\text{gr}},05$ et qui ne donna pas de précipité avec P-T).

Essai n° 9. Le dérivé benzoylé de 5 gr. d'oxyacide (préparé de la même manière que celui qui servait aux essais n° 5 et 6) fut dédoublé par chauffage pendant $2 + 1$ heures, en présence de $200 + 100$ cc. d'acide chlorhydrique concentré, dans un ballon de 1 l. placé dans le bain d'huile, dont on éleva peu à peu la température vers 150° . Malheureusement, on perdit par accident la majeure partie de la substance; néanmoins on put constater, presque avec certitude, que ce traitement avait transformé en acide pyrrolidinecarbonique 30 à 40 % de l'oxyacide employé. L'acide pyrrolidinecarbonique ainsi formé fut précipité à l'état de sel phosphotungstique, qu'on décomposa par le procédé ordinaire, après quoi l'acide fut reprécipité par P-T. De ce précipité j'ai tiré l'acide pyrrolidinecarbonique, qui alors m'a fourni le sel cuivrique sous la forme de feuillets caractéristiques rhomboïdaux d'une belle couleur bleue.

0^{gr},1323 de sel cuivrique séché à l'air, cédèrent dans le vide, à 70°, 0^{gr},0146 d'eau (11,04 %; calculé 10,99 %), puis au dosage de l'azote donnèrent de l'ammoniaque correspondant à 11^{cc},33 d'hypo-sulfite (8,56 % d'azote; calculé 8,57 %).

Il ressort des essais n^{os} 5—9 que par une ébullition prolongée en présence d'acide chlorhydrique ou sulfurique très faible, le dérivé benzoylé de l'oxyacide peut se dédoubler complètement sans qu'il se forme plus d'une trace d'acide pyrrolidinecarbonique. Dédoublé au moyen d'acide chlorhydrique concentré, un tiers environ de l'oxyacide se convertit en acide pyrrolidinecarbonique, c'est-à-dire une quantité semblable à celle que donne le traitement de l'oxyacide pur par ébullition en présence d'acide chlorhydrique fort.

c. Éthérification de l'oxyacide. Comme nous l'avons mentionné plus haut (v. p. 176), il y aura grand intérêt à savoir d'une manière exacte comment l'oxyacide se comporte dans l'éthérification, suivie d'une distillation dans le vide de l'éther-sel libre, par le procédé indiqué par E. Fischer¹⁾ et qu'il a employé avec tant de succès. C'est dans le but d'éclaircir cette question que j'ai effectué l'essai n^o 10 que voici.

Sur 15 gr. d'oxyacide se trouvant dans un ballon de 1 l., on verse 100 cc. d'alcool absolu, et sans réfrigérer on y conduit du chlorure d'hydrogène sec jusqu'à ce que celui-ci commence à passer inabsorbé. On fait subir à la solution limpide et chaude encore un chauffage d'un quart d'heure au bain-marie, puis une évaporation dans le vide jusqu'à consistance huileuse. Ensuite, on reprend par 100 cc. d'alcool absolu et sature, en réfrigérant à la glace, de chlorure d'hydrogène sec, ce qui fait déposer au fond du ballon une huile visqueuse, constituée vraisemblablement par du chlorhydrate de l'éther oxyaminé et qui, par chauffage au bain-marie pendant 1/4 d'heure, se redissout complètement. On distille alors l'alcool dans le vide aussi complètement que possible, à une température ne dépassant pas 40°, et l'on étend l'huile restante par environ la moitié de son volume d'eau. Enfin on prélève un échantillon (marqué »Échantillon I«, v. p. 182).

On verse dans le reste de la solution 300 cc. d'éther, puis refroidit bien dans un mélange de sel marin et de glace. Cela

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 33, 153 (1901).

fait, on ajoute, en agitant soigneusement, des doses successives d'une solution également bien refroidie d'une partie d'hydroxyde de sodium dans deux parties d'eau. Une réaction fortement alcaline s'étant manifestée, on ajoute une solution saturée et refroidie de carbonate de potassium, ainsi que du carbonate de potassium solide, en secouant et refroidissant constamment dans le mélange réfrigérant. On décante la couche étherée surnageante et secoue de nouveau avec 3×150 cc. d'éther, après une addition renouvelée d'un peu de lessive de soude et de carbonate de potassium, et en faisant refroidir toujours bien soigneusement. On abandonne à elle-même la masse insoluble à l'éther (désignée dans la suite par »R.«, v. p. 184), et on sèche rapidement les extraits étherés en secouant avec du carbonate potassique solide, déliquescent d'abord, mais qu'on peut finalement, en agitant, réduire en poudre fine. Après avoir séparé celle-ci par filtration et lavé deux fois à l'éther sec, on laisse reposer le liquide filtré une nuit durant en contact avec du sulfate de sodium fraîchement déshydraté. Après filtration, on distille la majeure partie de l'éther, et retient dans le ballon une partie du résidu, pour servir d'échantillon (»Échantillon II«, v. p. 183), tandis qu'on en transvase la majeure partie dans un petit ballon à fractionner.

Après distillation de l'éther sous la pression de l'atmosphère, on réduit la pression jusqu'à 16 mm., puis chauffe rapidement dans le bain d'huile, en plaçant le récipient dans un mélange réfrigérant. Ce n'est que lorsque la température du bain d'huile s'approche de 150° que commence la distillation; le thermomètre se trouvant dans le col du ballon, marque alors 70° , et monte lentement et régulièrement jusqu'à 103° , en même temps que la température du bain d'huile a atteint 240° . Même encore une fort petite quantité du liquide a passé, et en continuant à chauffer on provoqua la formation de vapeurs blanches dans le ballon, et en même temps la pression commença à augmenter. Ces deux phénomènes sont l'un et l'autre des signes d'un commencement de décomposition avec dégagement gazeux; ils m'amenèrent à interrompre la distillation. J'ai examiné séparément le distillat (désigné dans ce qui suit par »D«, v. p. 183) et le résidu de la distillation (désigné dans ce qui suit par »D. R.«, v. p. 184).

Échantillon I (v. p. 181). On fit dissoudre l'échantillon dans 300 cc. environ d'eau, et saponifia l'éther-sel en chauffant au bain-marie pendant une demi-heure avec un excès d'eau de

baryte. Ensuite on précipita tout le baryum par un excès aussi petit que possible d'acide sulfurique. La solution contenait en tout 216 mgr. d'azote; on en évalua l'acide pyrrolidinecarbonique par le procédé précédemment décrit.

Le résidu de l'évaporation était solide et cristallin; il pesait 2^{gr},05. Après un traitement par l'alcool absolu, 1^{gr},80 d'oxyacide restèrent à l'état indissous (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T), tandis que la solution alcoolique laissait un résidu résineux du poids de 0^{gr},2. La quantité y contenue d'acide pyrrolidinecarbonique répondait à environ 1 cc. de P-T, soit à 10 mgr. environ d'azote. Le sel phosphotungstique présentait le bel aspect caractéristique déjà mentionné.

Il ressort donc que l'éthérification a converti environ 5 % de l'oxyacide en acide pyrrolidinecarbonique.

Échantillon II (v. p. 182) fut soumis au même traitement que le précédent. La teneur totale d'azote était de 136 mgr.

Le reste de l'évaporation, solide et cristallin, pesait 1^{gr},30. En le traitant par l'alcool absolu, on eut 0^{gr},9 d'oxyacide restés indissous (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T), tandis que la solution alcoolique laissa un résidu pesant 0^{gr},35; la quantité d'acide pyrrolidinecarbonique y contenue, répondait à environ 2 cc. de P-T, soit à 20 mgr. environ d'azote; ici encore, le sel phosphotungstique avait le bel aspect caractéristique.

Cet échantillon renferme donc environ 15 % de la quantité d'azote à l'état d'acide pyrrolidinecarbonique, le reste à l'état d'oxyacide.

Le distillat D (v. p. 182), bien que sentant l'alcool, laissait nettement percevoir une odeur particulière, hétérogène. Étendu avec de l'eau, il se troubla légèrement, et l'on ne réussit pas à l'éclaircir par filtration. La solution d'une réaction fortement alcaline, fournit au moyen de P-T un précipité soluble dans l'alcool, elle contenait 40 mgr., en tout, d'azote. Du reste, la solution fut soumise au même traitement que l'échantillon I; seulement il faut noter que l'addition de l'eau de baryte provoqua l'apparition d'un précipité blanc, qu'on recueillit et lava. On reconnut qu'il était formé de carbonate de baryum, provenant évidemment de l'acide carbonique auquel, au cours de la distillation, la décomposition de l'oxyacide avait donné naissance.

Le résidu d'évaporation était presque parfaitement cristallin

et avait un poids de $0^{\text{gr}},35$. Il était soluble dans l'alcool absolu même froid, ne laissant que des flocons qu'on ne put peser. La solution alcoolique évaporée redonna les $0^{\text{gr}},35$, dont la teneur en acide pyrrolidinecarbonique répondait à 4 cc. environ de P-T, soit à 40 mgr. d'azote; ici encore, le sel phosphotungstique avait le bel aspect qui le caractérise.

Le distillat D ne renfermait donc d'autre combinaisons azotées que l'acide pyrrolidinecarbonique.

Le résidu de distillation D-R (v. p. 182) constituait une masse brunâtre résineuse, dont la solution aqueuse était un liquide jaune tirant sur le rouge, de réaction très faiblement alcaline. Cette solution contenait, en tout, 275 mgr. d'azote¹⁾ et fournit, au moyen de P-T, un précipité soluble dans l'alcool.

Après avoir chauffé la solution une demi-heure au bain-marie avec 200 cc. d'eau de baryte saturée à froid, on élimina le baryum par un excès aussi petit que possible d'acide sulfurique. On décolora ensuite le liquide filtré avec du noir animal, et puis on évapora la solution, qui alors ne contenait plus que 170 mgr. d'azote, jusqu'à consistance résineuse. Le poids en était de $1^{\text{gr}},5$, dont $0^{\text{gr}},2$ seulement étaient insolubles dans l'alcool absolu. Ces $0^{\text{gr}},2$ ne contenaient à coup sûr pas d'oxyacide; car même dans une solution aqueuse très étendue, le P-T donna un abondant précipité microcristallin difficilement soluble tant dans l'eau chaude que dans l'alcool.

La solution alcoolique laissa une masse huileuse ou sirupeuse du poids de $1^{\text{gr}},3$. Cette dernière était sans doute de constitution hétérogène, mais ne contenait pas d'acide pyrrolidinecarbonique; car la solution aqueuse n'a exigé que 6 cc. de P-T, correspondant à 60 mgr. d'azote, pour être précipitée complètement, alors que dans le liquide filtré du sel phosphotungstique il y avait 56 mgr. d'azote non précipitable par le P-T. Le sel phosphotungstique s'isola immédiatement en masse solide (non pas, comme dans le cas de l'acide pyrrolidinecarbonique, à l'état huileux d'abord), c'est-à-dire sous la forme d'un volumineux dépôt amorphe et sans aspect caractéristique.

La masse R restée non dissoute dans l'éther (v. p. 182)

¹⁾ En outre, il s'était déposé dans le col du ballon une petite quantité d'un joli produit blanc et cristallin de sublimation, à propos duquel je ne saurais rien dire, si ce n'est qu'il est soluble, à réaction neutre, dans l'eau, et que le P-T, réagissant sur la solution aqueuse, donna un précipité soluble dans l'alcool.

fut dissoute dans de l'eau et chauffée une demi-heure au bain-marie pour saponifier l'éther-sel, après quoi l'on neutralisa par l'acide chlorhydrique et concentra fortement la solution, dont la teneur en azote était de 825 mgr. Après avoir ajouté une dose d'acide chlorhydrique un petit peu plus grande que celle qui correspondait à la quantité d'azote, on continua l'évaporation jusqu'à consistance de bouillie, et, refroidissant à la glace, on tritura cette masse à l'alcool absolu. Après avoir étendu d'eau la solution alcoolique et distillé l'alcool dans le vide, on évapora de nouveau jusqu'à consistance sirupeuse ou de bouillie, puis traita par l'alcool absolu, en refroidissant à la glace. On renouvela ce dernier traitement afin d'éliminer le dernier reste de chlorures de potassium et de sodium. Finalement, par le procédé ordinaire au moyen de carbonate d'argent, on enleva l'acide chlorhydrique aux chlorhydrates solubles des acides aminés, et l'on évapora la solution.

Le résidu de l'évaporation, qui était constitué de beaux cristaux, laissa par traitement à l'alcool absolu 7^{gr},3 d'oxyacide (0^{gr},2 se sont dissous à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T), tandis que la solution alcoolique donna un reste brun résineux du poids de 0^{gr},5. Ce reste fut dissous dans 10 cc. d'eau, et la solution précipitée comme précédemment au moyen de P-T. La précipitation en demanda 4 cc. répondant à 40 mgr. d'azote. Mais dans le précipité, même après une recristallisation dans de l'eau, on n'apercevait que quelques rares cristaux ayant la forme caractéristique du sel phosphotungstique de l'acide pyrrolidinecarbonique; le reste du précipité était de structure microcristalline et se dissolvait assez difficilement tant dans l'eau chaude que dans l'alcool.

Ici nous nous trouvons probablement en présence d'un produit de polymérisation de l'oxyacide formé par l'action de la forte lessive alcaline sur l'éther-sel, parce que ce ne fut que 2 ou 3 jours après le traitement par l'éther qu'on procéda à la dissolution dans l'eau et au traitement subséquent.

Comme on l'a dit plus haut, on s'est servi comme matière première dans cet essai, de 15 gr. d'oxyacide, contenant 1583 mgr., en tout, d'azote. Or, il résulte de nos essais que

Échantillon I contient	216 mgr. d'azote
Échantillon II	136 — —
	<hr/> 352 mgr. d'azote

	352 mgr. d'azote		
Distillat D	40	—	—
Reste de distillation D-R	275	—	—
La masse restée insoluble dans l'éther R	825	—	—
Total...	1492 mgr. d'azote		

L'analyse de l'échantillon I montre que par l'éthérification même 5 % environ de l'oxyacide se sont convertis en acide pyrrolidinecarbonique, dont, par conséquent, la teneur totale en azote doit être environ $\frac{5}{100} \times 1583 \text{ mgr.} = 79 \text{ mgr.}$ environ. Échantillon I en contient environ 10 mgr., tandis qu'à peu près tout le reste, environ 69 mgr., se trouve dans l'extrait étheré (Échantillon II: 20 mgr. env. + Distillat D: 40 mgr. env.).

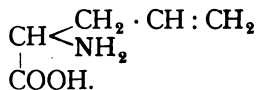
Il ressort donc de cet essai:

1° Qu'une petite portion de l'oxyacide se convertit, par éthérification d'après la méthode de Fischer, en éther pyrrolidinecarbonique.

2° Que, d'un côté, l'éther-sel de l'oxyacide peut difficilement et très incomplètement être extrait au moyen d'éther par le procédé indiqué par Fischer, tandis que l'éther pyrrolidinecarbonique formé simultanément entre presque totalement en solution étherée.

3° Le chauffage dans le vide d'un mélange des éthers-sels de l'oxyacide et de l'acide pyrrolidinecarbonique ne fait distiller que ce dernier éther-sel, tandis que le premier se scinde en cédant l'alcool. Le résidu de la distillation ne contient ni l'oxyacide, ni l'acide pyrrolidinecarbonique¹⁾.

4. Glycocolle allylique.



Le procédé dont j'ai fait usage m'ayant fourni un rendement satisfaisant en glycocolle allylique, je vais le décrire ici; toutefois

¹⁾ Il va de soi que ce que je viens de dire n'est vrai que lorsque la distillation se fait sous une pression d'environ 16 mm. Quant à la question de savoir quelle serait la marche de la distillation sous une pression inférieure à 1 mm., avec réfrigération du récipient au moyen d'air liquéfié, — procédé dont Fischer s'est servi dans ses fractionnements ultérieurs d'éthers aminés, — les faits établis ne permettent de rien affirmer de positif.

il convient de faire remarquer que je n'ai eu occasion de m'en servir qu'une seule fois et que, par conséquent, il est probablement susceptible de modifications et d'améliorations sur plusieurs points. C'est là un bon exemple de la marche facile d'une pareille synthèse au moyen d'éther phtalimidosodomalonique et d'un bromure ou iodure qu'on peut facilement se procurer.

On chauffa $\frac{1}{6}$ molécule-gramme d'éther phtalimido-sodomalonique dans le bain d'huile avec un grand excès d'iodure allylique récemment distillé (employé 240 gr., calculé 34 gr.). Après 3 heures de chauffage à 125° (la température du bain), la réaction paraissait déjà achevée; mais un échantillon prélevé montra que la réaction du dépôt était encore nettement alcaline. On continua alors le chauffage pendant 8 heures, faisant monter lentement la température du bain jusqu'à 140° . Pas même à ce moment-là le dépôt n'avait de réaction tout à fait neutre; mais on put constater que la quantité d'éther phtalimido-sodomalonique inaltéré était très faible; car en traitant la masse par l'éther on obtint un résidu essentiellement constitué d'iodure de sodium et dont la teneur totale en azote était de 10 mgr. seulement.

On distilla l'éther de la solution étherée, puis l'excès d'iodure allylique fut entraîné par un courant de vapeur d'eau. Ensuite on traita par un peu d'hyposulfite le résidu brun, huileux, insoluble dans l'eau, afin d'éliminer l'iode libre. Le résidu fut dissous dans l'éther et la solution étherée desséchée au moyen de chlorure de calcium, puis on chassa l'éther, et il resta une huile brunâtre, qu'on ne put faire figer et dont le poids était de 71 gr. (Le poids calculé d' $\frac{1}{6}$ molécule-gramme d'éther allyle-phtalimidomalonique est de 69 gr.).

Un échantillon prélevé donnant par chauffage en présence d'acide sulfurique concentré un développement bien prononcé d'iode, on a extrait à chaud avec $1 + \frac{1}{2} + \frac{1}{2}$ l. d'éther de pétrole, qui ne dissolvait pour ainsi dire que la combinaison allylique pure; en chassant l'éther de pétrole, on obtint ce composé sous forme d'une huile jaune. Obtenu 62 gr. ou environ 90 % de ce que donne la théorie. On n'y trouvait qu'une trace minime d'iode, et la teneur en azote était de 4,04 %, tandis que le calcul avait indiqué 4,07 %¹⁾.

¹⁾ Le résidu non dissous dans l'éther de pétrole présentait une coloration brune, pesait 8 gr,5 et contenait 3,72 % d'azote avec des quantités appréciables d'iode. Il était facilement soluble à l'éther; ce dernier évaporé, le résidu restait sous

On fit dissoudre 60 gr. de l'éther allyle-phthalimidomalonique susmentionné presque parfaitement pur dans 400 cc. d'alcool à 93 %, et l'on versa la solution ainsi obtenue dans une solution chaude de 158 gr. d'hydroxyde de baryum (1 équivalent) dans $\frac{1}{2}$ l. d'eau. Aussitôt ce mélange effectué, il se produisit un précipité blanc, volumineux, dont l'apparence ne changea guère en chauffant (dans une capsule en porcelaine de 2 l.) au bain d'eau bouillante en remuant fréquemment pendant 3 heures, ce qui chassa la majeure partie de l'alcool. A la masse encore chaude et qui avait pris la consistance de bouillie peu claire, on ajouta un mélange de 80 gr. d'acide sulfurique concentré et 400 cc. d'eau, et il se produisit alors un dégagement d'acide carbonique provenant du dédoublement de l'acide malonique substitué mis en liberté. Après une demi-heure de chauffage au bain-marie, on sépara par filtration le sulfate de baryum déposé¹⁾, et l'on évapora le liquide filtré jusqu'au volume de $\frac{1}{4}$ l., puis refroidit, finalement dans de l'eau glacée. Ayant séparé par filtration l'acide phthalique déposé, on a extrait du filtrat, à l'éther²⁾, le reste de cet acide (obtenu, en tout, 27 gr. d'acide phthalique; calculé 28 gr,7). La solution débarrassée de l'acide phthalique fut portée au bain-marie afin de chasser l'éther dissous, après quoi une petite quantité d'acide iodhydrique fut précipitée par du sulfate d'argent, et l'acide sulfurique par un déficit aussi petit que possible d'hydroxyde de baryum. La solution ainsi obtenue fut évaporée dans le vide jusqu'à 200 cc. Ensuite on évapora le liquide filtré jusqu'à cristallisation au bain-marie. Après refroidissement et repos jusqu'au lendemain, il s'était déposé un beau précipité blanc, soyeux, lamellé (Glycocolle allylique I: 5 gr,1), et dans l'eau mère et celle de lavage on précipita, par le double volume d'alcool, un nouveau précipité d'aspect tout à fait semblable.

forme d'une huile brune, résineuse qui, traitée par l'éther de pétrole, y abandonna encore 3 gr,5 de composé allylique à peu près pur. Cette substance accusait une teneur en azote de 3,90 % sans être exempt d'iode. On décolora au noir animal la solution alcoolique du reste insoluble à l'éther de pétrole. L'alcool chassé, on versa le double volume d'éther de pétrole dans la solution étherée; il se précipita alors une huile résineuse qui, dissoute dans l'éther et évaporée à sec, put être réduite en poudre et dont la composition était assez complexe; car elle contenait 3,67 % d'azote et 13,91 % d'iode.

¹⁾ Dans ce sulfate de baryum on pouvait constater une teneur en acide phthalique; en outre il contenait 72 mgr. d'azote.

²⁾ Les extraits étherés étaient très faiblement colorés d'iode dissous, formé sans doute par oxydation d'une quantité insignifiante d'iodure d'hydrogène.

(Glycocolle allylique II: 6^{gr},2.) Enfin, en évaporant l'eau-mère de celui-ci jusqu'à petit volume et précipitant par 4 fois le volume d'alcool, on obtint un troisième produit (Glycocolle allylique III; 4^{gr},4), qui contenait une faible portion d'acide sulfurique, et offrait d'ailleurs le même bel aspect que les deux premiers produits: de même que ceux-ci, il était constitué de beaux feuillets rhomboidaux, souvent à pans coupés, c'est-à-dire ayant la forme de lamelles hexagonales.

Les analyses ci-dessous montrent que les produits obtenus sont constitués de glycocolle allylique presque pure, mêlée, surtout dans le premier produit, à une toute petite portion probablement de glycocolle. Le rendement total: 15^{gr},7, atteint 78,5 % du calcul (60 gr. d'éther allyle-phtalimidomalonique répondent à 20 gr. de glycocolle allylique). Il faut ajouter que l'eau-mère de la glycocolle allylique III renfermait encore de la glycocolle allylique, qu'on en put retirer à l'état de sel cuivrique. Après avoir distillé l'alcool, on chauffa avec du carbonate de cuivre le résidu, dissous dans de l'eau. Le sel cuivrique ne tarda pas à s'isoler, surnageant le liquide sous forme d'une masse volumineuse d'un bleu clair, très difficilement soluble dans l'eau, qui l'humectait à peine. On sépara par filtration le mélange de sel cuivrique et de carbonate de cuivre, puis l'épuisa au bain d'eau bouillante avec 3 + 1 l. d'eau en tout; alors, la majeure partie du sel cuivrique de la glycocolle allylique entra en dissolution, ce qui permit de le récupérer, par évaporation jusqu'à 100 cc., sous forme d'un volumineux dépôt, bleu clair, cristallin (en apparence lamellé) qui, regardé au microscope, n'offrait guère des formes caractéristiques (le rendement: 0,8^{gr} 6).

Nous avons vu que la glycocolle allylique brute, particulièrement celle désignée comme « glycocolle allylique I », contenait une très petite proportion de glycocolle, dont l'analyse révélait la présence (teneur un peu trop élevée en azote, et trop petite en carbone, v. p. 191). En faisant recristalliser dans de l'alcool de concentrations différentes, on ne parvint pas à séparer la glycocolle allylique d'avec la glycocolle; mais en les transformant en sels cuivriques, on y réussit.

Après avoir dissous dans une abondante quantité d'eau chaude des restes de glycocolle allylique provenant de divers essais de recristallisation, on chauffa la solution au bain-marie en présence d'un excès de carbonate de cuivre. Tandis que la

glycocolle entraînait alors en dissolution à l'état de sel cuivrique — peut-être comme dans le cas de l'oxyacide (v. p. 159) à l'état d'un sel double de glycocolle allylique et de glycocolle — la majeure partie de la glycocolle allylique donna un précipité volumineux et très peu soluble du sel cuivrique comme précédemment mentionné, et mélangé naturellement à l'excès du carbonate cuivrique. Après avoir séparé ce mélange par filtration, on le lava à l'eau chaude et le fit dissoudre dans de l'acide sulfurique étendu. Après précipitation du cuivre par sulfure d'hydrogène, on expulsa par ébullition l'excès de ce dernier et précipita l'acide sulfurique par un déficit aussi petit que possible d'hydroxyde de baryum, et obtint, après avoir évaporé puis précipité par l'alcool la solution obtenue, de la glycocolle allylique parfaitement pure (désignée ci-après comme glycocolle allylique purifiée).

Avant de les analyser, on dessécha dans le vide à 70° tous les échantillons de glycocolle allylique et de sel cuivrique; ils ne perdirent presque rien de leur poids.

0 gr, 2135 de glycocolle allylique I (v. p. 188) ont donné une quantité d'ammoniaque correspondant à 26 cc, 32 d'hyposulfite, ce qui répond à 12,33 % d'azote.

0 gr, 1571 de glycocolle allylique I ont donné 0 gr, 2955 d'acide carbonique (51,30 % de carbone) et 0 gr, 1122 d'eau (7,99 % d'hydrogène).

0 gr, 1946 de glycocolle allylique II (v. p. 188) ont donné de l'ammoniaque correspondant à 23 cc, 88 d'hyposulfite (12,27 % d'azote).

0 gr, 1625 de glycocolle allylique II ont donné 0 gr, 3080 d'acide carbonique (51,69 % de carbone) et 0 gr, 1200 d'eau (8,26 % d'hydrogène).

0 gr, 1234 de glycocolle allylique III (v. p. 189) ont donné de l'ammoniaque correspondant à 14 cc, 83 d'hyposulfite (12,02 % d'azote).

0 gr, 2261 de glycocolle allylique purifié ont donné de l'ammoniaque correspondant à 27 cc, 37 d'hyposulfite (12,11 % d'azote).

0 gr, 1672 de glycocolle allylique purifiée ont donné 0 gr, 3180 d'acide carbonique (51,87 % de carbone) et 0 gr, 1173 d'eau (7,85 % d'hydrogène).

0 gr, 1348 du sel cuivrique de la glycocolle allylique (v. p. 189) ont donné de l'ammoniaque correspondant à 12 cc, 92 d'hyposulfite (9,58 % d'azote).

0 gr, 1115 du même sel cuivrique ont donné 0 gr, 1670 d'acide carbonique (40,85 % de carbone) et 0 gr, 0579 d'eau (5,81 % d'hydrogène).

0 gr, 1298 du même sel cuivrique ont donné 0 gr, 0353 d'oxyde cuivrique (21,73 % de cuivre).

		Calculé	Trouvé			
			I	II	III	purifiée
C ₈	60,00	52,12	51,30	51,69		51,87
H ₈	9,07	7,88	7,99	8,26		7,85
O ₂	32,00	27,80				
N	14,04	12,20	12,33	12,27	12,02	12,11
<hr/>						
C ₈ H ₈ O ₂ N	115,11	100,00				
			Calculé		Trouvé	
C ₁₀		120,00	41,12		40,85	
H ₁₆		16,13	5,53		5,81	
O ₄		64,00	21,93			
N ₂		28,08	9,62		9,58	
Cu		63,60	21,80		21,73	
<hr/>						
(C ₈ H ₈ O ₂ N) ₂ Cu	291,81	100,00				

Au chauffage, l'échantillon purifié et les échantillons non purifiés de glyocolle allylique, se comportaient identiquement; ils commencèrent à brunir vers 200° et ne fondirent qu'entre 250° et 252° (corr.) avec un vif dégagement gazeux.

La glyocolle allylique est doux au goût et assez facilement soluble dans l'eau, mais presque insoluble dans l'alcool absolu. L'acide phosphotungstique ne précipite pas la solution aqueuse; 0^{sr},2 de glyocolle allylique se dissolvent à limpidité complète dans 2^{cc},5 de P-T; abandonnée jusqu'au lendemain, la solution, agitée à diverses reprises, dépose des cristaux prismatiques, quadrilatères et hexagonaux, assez facilement solubles tant dans l'eau que dans l'alcool (comparez l'oxyacide p. 168).

Une solution aqueuse de glyocolle allylique décolora instantanément l'eau bromée, probablement en donnant naissance à un mélange de produits d'addition ou de 2 atomes de brome ou de brome et d'oxhydrile¹⁾; ce n'est qu'en ajoutant un excès d'eau bromée qu'on peut constater un dégagement gazeux. Probablement il ne sera guère difficile, en partant du mélange mentionné ci-dessus, de préparer l'acide α -amino- γ - δ -dioxyvalérique; toutefois, on pourra l'obtenir plus facilement en effectuant la bromuration à un stade moins avancé de la préparation. On peut obtenir l'éther allyle-phtalimidomalonique mentionné plus haut (v. p. 187) à l'état presque pur avec un rendement d'environ

¹⁾ Comparez: E. Biilmann: Journ. prakt. Ch. N. F. 61, 218 (1900).

90 % de la théorie, et additionné de 2 atomes de brome il donnera naissance à un bromure qui, traité par l'acétate potassique, puis décomposé par l'hydroxyde de sodium et l'acide chlorhydrique, donnera certainement l'acide amino-dioxyvalérique sus-indiqué. Aussitôt que nous en aurons le loisir, nous essayerons de faire cette synthèse dans notre laboratoire, et nous verrons si, à l'instar de la transformation en acide pyrrolidinecarbonique de l'oxyacide mentionné dans le présent mémoire, on ne peut pas convertir l'acide α -amino- γ - δ -dioxyvalérique en l'acide oxy-pyrrolidine- α -carbonique, découvert par E. Fischer parmi les produits de dédoublement de protéines, ou en une combinaison isomère.

En janvier 1905.

LA TENEUR EN AZOTE DE LA LYSINE ET DES COMPOSÉS ANALOGUES PEUT-ELLE ÊTRE DOSÉE PAR LA MÉTHODE DE KJELDAHL?

PAR

S. P. L. SØRENSEN ET A. C. ANDERSEN.

DANS un mémoire¹⁾ publié il y a un an et demi, S. P. L. Sørensen et C. Pedersen démontrèrent que, contrairement aux assertions de Fr. Kutscher et H. Steudel²⁾, on peut très bien faire par la méthode de Kjeldahl le dosage de l'azote des substances telles que la créatine, la créatinine, l'acide urique et la lysine. Cependant, comme c'est indiqué à la dernière page du mémoire cité, les auteurs avaient reconnu que, — par opposition aux trois premières substances, dont l'analyse suivant la méthode Kjeldahl n'offrait aucune difficulté, — la lysine appartient à cette catégorie de substances qui, par chauffage en présence d'acide sulfurique concentré, abandonnent difficilement tout leur azote à l'état d'ammoniaque. Dans quelques analyses faites plus tard d'un dérivé de la lysine, l'acide lysurique (dibenzoylle-lysine), ces difficultés se sont fait sentir encore plus nettement; car, même par 24 heures d'ébullition, un dosage ordinaire suivant la méthode Kjeldahl ne put donner plus de 7,56 % d'azote dans l'acide lysurique pur, pour lequel la théorie indique 7,93 %. Certes, cet écart est bien moindre que celui trouvé, en appliquant le procédé Kjeldahl, par Kutscher et Steudel³⁾, ainsi qu'antérieurement par Y. Henderson⁴⁾, en analysant des combinaisons de lysine d'après Kjeldahl; mais, néanmoins, c'est un écart

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 39, 513 (1903); ces mêmes Comptes-rendus 6, 126.

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 39, 12 (1903).

³⁾ A l'endroit cité.

⁴⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 29, 322 (1900).

assez grave. En effet, la lysine constitue un très important produit de décomposition de presque toutes les substances protéiques, et fait probablement partie intégrante de la molécule protéique de façon que l'azote y est lié d'une manière analogue à celle de l'azote de l'acide lysurique: $\begin{array}{c} | \\ -\text{C}-\text{NH}-\text{CO}- \\ | \end{array}$; en conséquence, nous ren-

contrerons vraisemblablement dans l'analyse des substances protéiques les mêmes difficultés qu'offre celle de l'acide lysurique; seulement l'erreur est moins apparente ici, parce que l'azote de la lysine n'est qu'une petite partie de la totalité de l'azote.

Il est évident que plus la matière à analyser contiendra de lysine, plus grande sera l'erreur, et c'est pourquoi nous avons pensé qu'il y avait grand intérêt à établir

1^o la cause qui fait que, dans le dosage ordinaire de l'azote d'après Kjeldahl, les combinaisons de la lysine abandonnent difficilement la totalité de leur azote à l'état d'ammoniaque; et

2^o la manière dont on pourrait lever ces difficultés.

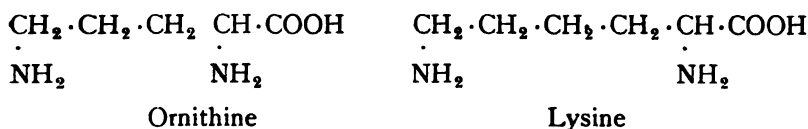
Henderson, ne s'appuyant, il est vrai, que sur un seul essai, admet comme possible qu'en chauffant longtemps de la lysine avec de l'acide sulfurique concentré, il s'échappe une substance azotée volatile. Kutscher et Steudel ont précisé cette idée: S'appuyant sur leurs propres essais et sur ceux de Zickgraf¹⁾ et Herzog²⁾ (tous ces essais avaient démontré que, oxydés par le permanganate de baryum, la lysine, l'histidine, la créatine et la créatinine donnent de l'acide hydrocyanique), ils émettent l'hypothèse que l'ébullition de ces corps en présence d'acide sulfurique concentré pourrait également donner lieu à la production d'acide hydrocyanique. Cette manière d'expliquer la chose a été admise comme possible par Cohnheim dans la dernière édition (1904) de sa célèbre »Chemie der Eiweisskörper«, où il dit en parlant de la lysine: »Nach Henderson, Kutscher und Steudel liefert die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl nicht immer richtige Werte, vielleicht weil ein Teil des Stickstoffs zu Blausäure wird, wie dies bei der Oxydation mit Baryumpermanganat Zickgraf beobachtet hat.«

On verra plus loin que cette explication est mal fondée: même dans une ébullition — si prolongée qu'elle soit —

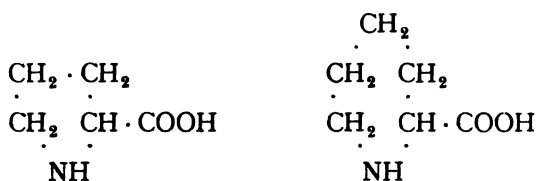
¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 3401 (1902).

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 37, 248 (1903).

des combinaisons de lysine en présence d'acide sulfurique concentré il n'y a point de perte d'azote. Il faut donc chercher l'explication ailleurs. En comparant entre elles les formules de l'ornithine et de la lysine, corps dont le premier se comporte d'une façon tout à fait normale dans le dosage ordinaire de l'azote d'après la méthode Kjeldahl:



on verra que les deux formules ne diffèrent l'une de l'autre que par un groupe CH_2 , et l'on ne comprend guère pourquoi, chauffé avec de l'acide sulfurique concentré, l'un des deux composés serait plus disposé que l'autre à dégager de l'acide hydrocyanique ou une autre substance azotée volatile et non alcaline. D'un autre côté, on serait porté à croire que, chauffés en présence d'acides forts, ces composés diamminés abandonneraient de l'ammoniaque avec fermeture de la chaîne, donc avec formation respectivement d'acide pyrrolidine- α -carbonique ou d'acide pipéridine- α -carbonique, et il n'y a rien d'étonnant à ce que de pareilles



Acide pyrrolidine- α -carbonique	Acide pipéridine- α -carbonique
---	--

combinaisons cycliques ne soient pas décomposées avec la même facilité par l'acide sulfurique concentré. Aussi, d'après les faits établis, est-il probable que c'est dans cette voie qu'il faut chercher l'explication; car non seulement l'acide pyrrolidine- α -carbonique, mais aussi toute une série de corps (acides α -amino- δ -oxyvalérique, α - δ -diaminovalérique etc.) susceptibles de former le noyau pyrrolidique, peuvent tous être analysés par la méthode Kjeldahl ordinaire. Par contre, il est très difficile, sinon impossible, de doser par ce procédé l'azote de la pyridine, de la pipéridine ou des composés susceptibles de former un noyau pipéridique (tels

que la lysine, l'acide α - ϵ -diaminopimélique et d'autres)¹⁾. Si l'on veut doser par la méthode Kjeldahl l'azote de ces composés, il est nécessaire de modifier cette méthode de telle façon que l'acide sulfurique puisse agir d'une manière plus énergique. On a tout d'abord la ressource d'élever le point d'ébullition de l'acide sulfurique (et par conséquent la température à laquelle la décomposition a lieu) en ajoutant du sulfate de potassium, ainsi que l'a proposé le premier Gunning²⁾. Aussi a-t-on pu constater que les composés sus-mentionnés même les plus difficilement décomposables peuvent s'analyser au moyen de la méthode Kjeldahl modifiée par Gunning; seulement il a fallu une ébullition très prolongée pour convertir intégralement l'azote en ammoniac. La décomposition s'opéra le plus facilement et le plus rapidement par la combinaison, primitivement proposée par Arnold et Wedemeyer³⁾, des modifications apportées par Gunning et par Arnold, combinaison qui, on le sait, consiste à ajouter non seulement du sulfate potassique, mais encore les agents catalytiques oxyde de mercure et oxyde de cuivre⁴⁾.

Aussi a-t-on pu établir que dans le dosage ordinaire d'après Kjeldahl il n'y a pas perte d'azote; car, après l'ébullition ordinaire en présence d'acide sulfurique et un petit peu d'oxyde cuivrique, on put, en ajoutant du sulfate potassique, de l'oxyde mercurique et de l'oxyde cuivrique, puis portant de nouveau à l'ébullition, achever la décomposition et obtenir la presque totalité de l'azote à l'état d'ammoniac.

¹⁾ Il y a lieu de rappeler ici que K. Andrlík (Zeitschr. f. Zuckerindustrie in Böhmen 26, 667 (1902)) a signalé que certains produits azotés tirés des résidus de la fabrication du sucre, ainsi que des substances telles que la bétanine et la caféine, fournissent par ébullition avec de l'acide sulfurique concentré, en plus de l'ammoniac, des corps qui résistent opiniâtrément à l'action de l'acide sulfurique. Andrlík est d'avis qu'il s'agit ici d'amines difficilement décomposables. Kutscher et Steudel, se rangeant à cet avis, émettent dans leur travail l'hypothèse que les difficultés de la méthode Kjeldahl signalées par eux peuvent s'expliquer de la même manière.

²⁾ Zeitschr. anal. Ch. 28, 188 (1889).

³⁾ Ibid. 31, 525 (1892).

⁴⁾ Comparez le beau travail de G. Bredig et J. W. Brown: «Katalytische Oxydationen organischer Substanzen mit konzentrierter Schwefelsäure» (Zeitschr. physik. Ch. 46, 502 (1903)). Les auteurs signalent, entre autres choses, que le sulfate de potassium n'a pas d'action catalytique, mais ne fait qu'élever la température. Il est démontré aussi dans cet ouvrage que l'action catalytique d'un mélange des sulfates mercurique et cuivrique est supérieure à la somme des actions de ces deux sels métalliques employés séparément.

Il appert donc que par un traitement par l'acide sulfurique concentré, l'azote de ces composés se comporte tout à fait comme l'on devait s'y attendre d'après la constitution desdits composés: à cet égard il n'y a pas de différence essentielle, mais seulement une différence graduelle entre ces corps et toutes les autres combinaisons aminées aliphatiques: quelques-uns sont plus facilement décomposables que les autres; ceux mentionnés ici sont au nombre des composés les plus difficilement décomposables; mais il n'est pas question d'une perte d'azote au cours du chauffage.

Ainsi on n'a pas rencontré jusqu'ici, parmi les produits de décomposition des protéines, aucune combinaison dont l'azote soit lié de telle manière qu'il ne puisse pas intégralement se convertir en ammoniacque par un chauffage convenable en présence d'acide sulfurique concentré. D'un autre côté, il ressort de ce que nous venons de dire que parmi lesdits produits de décomposition il peut se trouver des substances difficilement et parfois incomplètement décomposables par le procédé ordinaire de Kjeldahl. Par suite, dans l'analyse des matières protéïques ou de leurs produits de décomposition, il est toujours recommandable d'examiner si le dosage de l'azote d'après la méthode ordinaire de Kjeldahl, d'un côté, et, de l'autre, d'après la modification combinée de Gunning et Arnold¹⁾, donnent des résultats identiques: C'est seulement dans ce cas qu'on peut se servir de la méthode plus simple de Kjeldahl.

Arnold et Wedemeyer ont fait des recherches pour savoir comment un certain nombre de corps renfermant des anneaux azotés hétérogènes se comportent dans les dosages d'azote d'après les diverses modifications de la méthode Kjeldahl. Ces auteurs arrivent à cette conclusion²⁾ qu'un corps qui, dans un dosage ordinaire d'après Kjeldahl, donne moins d'ammoniacque qu'il ne le fait par la méthode modifiée de Gunning-Arnold, renferme des noyaux azotés. Conformément à cela, on a toujours regardé ce fait que les matières protéïques et leurs produits de décomposition peuvent être analysés suivant le procédé ordinaire de Kjeldahl, comme une preuve de l'absence des anneaux azotés dans la molécule de ces corps.

¹⁾ Même ici il est indispensable de faire bouillir pendant 3 heures au moins (voir les essais nos 50 à 59).

²⁾ A l'endroit cité, p. 530.

Les résultats communiqués dans le présent mémoire ne changent pas cette manière de voir, mais tendent pourtant à montrer que, du moins pour ce qui concerne les substances protéiques et leurs produits de décomposition, il faut donner à la thèse formulée par Arnold et Wedemeyer la forme un peu plus étendue que voici: »Si, dans un dosage ordinaire d'après Kjeldahl, une matière protéique, ou un de ses produits de décomposition, donne moins d'ammoniaque qu'elle ne le fait dans un dosage d'après la modification de Gunning-Arnold, elle renferme ou bien des substances difficilement décomposables à noyau azoté (telles que des dérivés de la pyridine ou de la pipéridine) ou bien des substances susceptibles d'en former par condensation interne.

Les dosages d'azote réunis ci-dessous en forme de tableaux, ont été effectués de différentes manières:

1^o Dosages d'après la méthode habituelle de Kjeldahl¹⁾ (désignés par »K«).

2^o Dosages d'après la modification de Gunning (désignés par »G«); on employa pour chaque essai 20 gr. de sulfate de potassium + 20 cc. d'acide sulfurique concentré.

3^o Dosages d'après la modification de Gunning-Arnold (désignés par »G-A«). On chauffa la substance pendant $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ heure avec un mélange de 1 gr. d'oxyde de mercure, 0^{gr},5 d'oxyde de cuivre, 5 gr. de sulfate de potassium et 20 cc. d'acide sulfurique concentré, ce qui fit virer au vert la couleur de la solution. Ensuite, après addition d'encore 15 gr. de sulfate potassique, on continua le chauffage. Dans ces dosages, ainsi que dans ceux indiqués sous la rubrique suivante (4^o), on s'est servi, pour la distillation de l'ammoniaque, d'un mélange de solutions d'hydroxyde et de sulfhydrate de sodium.

4^o Dans ces dosages on a soumis la substance à une ébullition prolongée, d'abord avec 20 cc. d'acide sulfurique concentré et un peu d'oxyde de cuivre, de même que dans un dosage ordinaire d'après Kjeldahl; ensuite on a ajouté 1 gr. d'oxyde

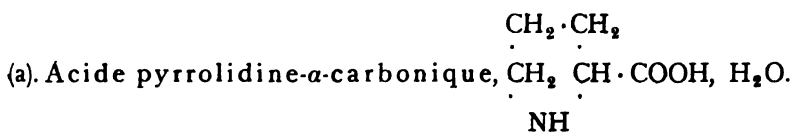
¹⁾ Description détaillée dans ces mêmes Comptes-rendus 6, 130.

de mercure, 0^{gr},5 d'oxyde de cuivre et 20 gr. de sulfate de potassium, puis repris l'ébullition comme dans un dosage suivant Gunning-Arnold. (Désignés par »K.—G.-A.«).

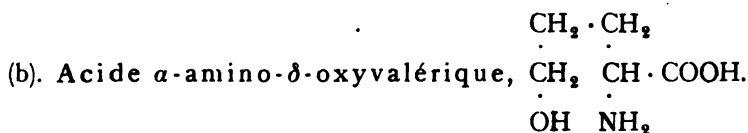
La durée de l'ébullition est indiquée pour chaque essai. Quant à l'oxydation au moyen du permanganate de potassium, on n'y a eu recours que dans les dosages ordinaires suivant Kjeldahl.

A. Composés renfermant ou susceptibles de former des anneaux à cinq chaînons constitués de quatre atomes de carbone et un atome d'azote.

Toutes les combinaisons appartenant à cette catégorie, ont pu être analysées d'après la méthode Kjeldahl ordinaire.



Quelques analyses, tant de l'acide libre (trouvé 10,38 % d'azote; calculé 10,55 %) que de son sel cuivrique, qui cristallise avec 2 molécules d'eau de cristallisation par atome de cuivre (trouvé 8,51—8,56 % d'azote; calculé 8,57 %), se trouvent dans le précédent mémoire, p. 156, 157, 175 et 181.



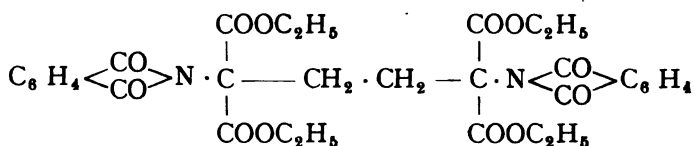
Un certain nombre d'analyses, tant de l'acide libre (trouvé 10,48—10,57 % d'azote; calculé 10,55 %) que de son sel cuivrique (trouvé 8,53—8,58 % d'azote; calculé 8,57 %), se trouvent dans le précédent mémoire, p. 161 et 163.



Des analyses d'un certain nombre de dérivés de cet acide (tels que l'acide α - δ -dibenzoyl-diaminovalérique, l'acide ornithu-

rique: trouvé 8,14—8,20 % d'azote; calculé 8,24 %) se trouvent dans ces mêmes Comptes-rendus 6, p. 32—57 (1902).

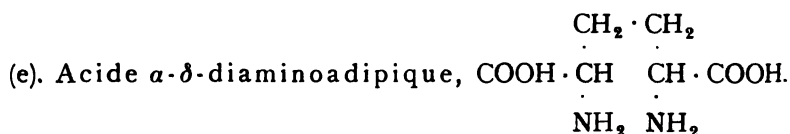
(d). Éther éthylène-diphthalimidomalonique,



On prépara ce composé par un traitement convenable de l'éther phthalimido-sodomalonique avec du bromure d'éthylène¹⁾.

Dosages d'azote. (Calculé: 4,41 % d'azote).

N° des essais	Poids de la substance	Proportion de l'ammoniaque correspondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Proportion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition
	gr.	cc.	%	
1	0,4195	18,26	4,35	K. Vert pur après 7 heures d'ébullition. Durée totale de l'ébullition 7 heures.
2	0,4055	17,66	4,36	K. Comme n° 1. Seulement durée de l'ébullition 9 heures.
3	0,4554	19,91	4,37	K. Comme n° 1. Durée de l'ébullition 11 heures.
4	0,4361	19,06	4,37	K. Comme n° 1. Durée de l'ébullition 20 heures.
5	0,4365	19,06	4,37	G.-A. Vert pur au cours d'une demi-heure, puis bouilli pendant 2 heures.



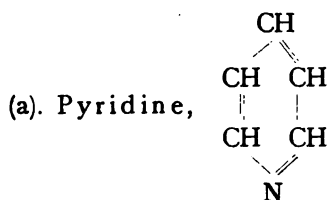
On prépara cet acide en partant de l'éther éthylène-diphthalimidomalonique sus-mentionné, par saponification au moyen d'hydroxyde de baryum, suivie d'une évaporation en présence d'acide chlorhydrique¹⁾.

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 147 (1905). (Communication préliminaire).

Dosages d'azote (calculé 15,94 % d'azote).

N ^o des essais	Poids de la substance	Proportion de l'ammo- niacque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Proportion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
6	0,0994	15,65	15,74	K. Vert pur après 1 heure d'ébullition; durée totale de l'ébullition 3 heures.
7	0,1293	20,40	15,78	K. Comme n ^o 6; pourtant chauffé pendant 10 heures.
8	0,1192	18,80	15,77	K. Comme n ^o 6; pourtant chauffé pendant 22 heures.
9	0,1753	27,72	15,81	G.-A. Bouilli pendant 3 heures en tout.

B. Combinaisons renfermant ou susceptibles de former des anneaux à six chaînons constitués de cinq atomes de carbone et un atome d'azote.



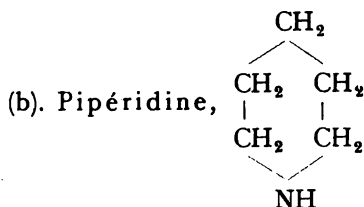
La pyridine employée dans ces analyses n'était pas tout à fait pure; car, dosée suivant la méthode Dumas, — méthode qui, comme d'habitude, a donné probablement des résultats un peu trop élevés¹⁾, — elle ne contenait que 17,63 % d'azote (calculé 17,75 %). Conformément, la modification Gunning-Arnold a donné 17,36 %, soit un peu moins de la teneur réelle en azote, qui était probablement de 17,5 % environ.

On mit 20 cc. d'acide sulfurique double-normal dans une fiole jaugée de 100 cc., puis pesa celle-ci, en employant comme contre-poids une fiole tout à fait analogue. Après addition d'environ 1^{cc},5 de pyridine, on pesa de nouveau; poids de la pyridine: 1^{gr},4027. Après abandon jusqu'au lendemain, on remplit la fiole, jusqu'au trait, d'eau distillée. On a employé pour chaque analyse 10 cc. de cette solution, correspondant à 0^{gr},1403 de pyridine. Après addition de 1 cc. d'acide sulfurique concentré, on évapora l'eau dans l'étuve à 120°, puis effectua les dosages de la manière habituelle; le chauffage en présence d'acide sulfurique concentré n'a pas produit de carbonisation.

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 136.

Dosages d'azote.

N ^o des essais	Poids de la sub- stance	Proportion de l'ammo- niacque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Propor- tion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	‰	
10	0,1403	22,95	16,36	K. Durée totale de l'ébullition 2 ³ / ₄ heures.
11	0,1403	22,75	16,22	K. — — — — 4 ¹ / ₄ —
12	0,1403	23,05	16,43	K. — — — — 6 ¹ / ₄ —
13	0,1403	22,95	16,36	K. — — — — 22 —
14	0,1403	24,35	17,36	G.-A. — — — — 2 ¹ / ₄ —



On prépara d'une manière analogue à celle employée dans le cas de la pyridine, deux solutions de pipéridine dans de l'acide sulfurique dilué; la première contenant 0^{gr},1721 de pipéridine par 10 cc., fut employée pour les essais n^{os} 15 à 21, la seconde, contenant 0^{gr},1518 de pipéridine par 10 cc., pour les n^{os} 22 à 27. Dans les essais n^{os} 15, 16 et 17 on a employé 10 cc. d'acide sulfurique concentré, dans tous les autres 20 cc. Même dans ce cas on n'a pu constater aucune carbonisation par l'ébullition en présence d'acide sulfurique concentré.

L'un de nous, en collaboration avec C. Pedersen, a déjà signalé dans le mémoire précité¹⁾ qu'une oxydation par le permanganate de potassium peut être nécessaire dans un dosage ordinaire par le procédé Kjeldahl, même si la couleur du liquide est d'un vert pur; car, malgré cela, la décomposition n'a pas été consommée. Les essais n^{os} 15 à 19 en fournissent un bon exemple. Durant l'ébullition, la solution a toujours conservé sa couleur vert pur, et néanmoins, même après 36 heures d'ébullition comme dans les essais n^{os} 18 et 19, la décomposition est loin d'être achevée. En effet, l'oxydation par le permanganate de potassium en a demandé abondamment, tant dans l'essai n^o 18 que dans les essais n^{os} 15 à 17, avant que la totalité de la matière organique fût oxydée et que la formation du dépôt vert foncé sale²⁾ commençât. Ainsi que le montre le tableau (ess. n^{os} 15 à 18), on a réussi dans les dosages ordinaires d'après Kjeld-

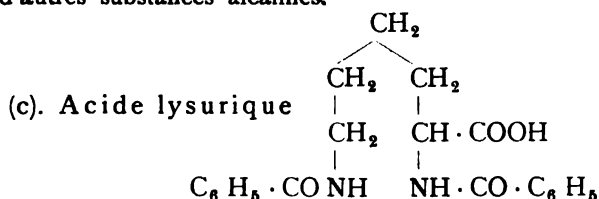
¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 129.

²⁾ A l'endroit cité, p. 131.

Dosages d'azote (calculé 16,49 % d'azote).

N° des essais	Poids de la substance	Proportion de l'ammoniaque correspondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Proportion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
15	0,1721	24,60	14,29	K. Durée totale de l'ébullition 3 ¹ / ₂ heures.
16	0,1721	24,90	14,47	K. — — — — 10 —
17	0,1721	25,30	14,70	K. — — — — 24 —
18	0,1721	25,40	14,76	K. — — — — 36 —
19	0,1721	18,60	10,81	K. — — — — 36 —; pas d'oxydation par le permanganate potassique.
20	0,1721	28,15	16,36	G.-A. Durée totale de l'ébullition 2 ¹ / ₂ heures.
21	0,1721	28,15	16,36	G.-A. — — — — 2 ¹ / ₂ —
22	0,1518	22,95	15,12	K. — — — — 12 —
23	0,1518	24,60	16,21	G. — — — — 12 —
24	0,1518	24,80	16,34	G. — — — — 18 —
25	0,1518	24,90	16,40	G.-A. — — — — 2 ¹ / ₂ —
26	0,1518	24,90	16,40	K.—G.-A. Chauffé d'après Kjeldahl pendant 16 heures, puis suivant G.-A. pendant 2 heures.
27	0,1518	24,80	16,34	K.—G.-A. Comme dans n° 26.

dahl, par oxydation au moyen de permanganate de potassium, à convertir en ammoniaque la plus grande partie de l'azote. Par contre, dans l'essai n° 19, où il n'y a pas eu oxydation par le permanganate, c'est à peine si les deux tiers de l'azote ont été convertis en ammoniaque. Du reste, au cours du titrage iodométrique effectué dans ce dernier essai, un *bleuissement subséquent* extraordinairement intense a fait voir que le distillat renfermait, en plus de l'ammoniaque, encore d'autres substances alcalines.



On a préparé l'acide lysurique en partant de la lysine racémique obtenue par voie de synthèse¹⁾, et à laquelle on a fait subir une benzoylation en milieu légèrement alcalin, puis une précipitation par l'acide chlorhydrique. On épuisa l'acide brut à l'éther de pétrole bouillant, ce qui le débarrassa de son acide benzoïque libre; puis on le soumit à une nouvelle cristallisation dans l'acétone. Un dosage par le procédé Dumas donna une teneur en azote de 7,98%.

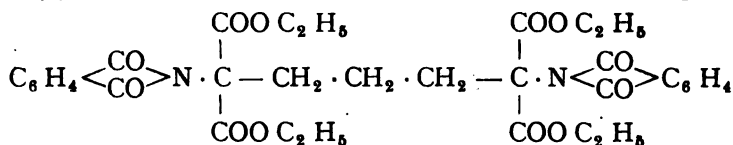
¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 60 (1902).

Dosages d'azote (calculé 7,93 %).

N ^o des essais	Poids de la sub- stance	Proportion de l'ammo- niaque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Propor- tion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
28	0,1942	13,97	7,19	K. Vert pur après 5 heures d'ébullition. Durée totale de l'ébullition 5 heures.
29	0,2443	18,21	7,45	K. Vert pur après 6 heures d'ébullition. Durée totale de l'ébullition 8 heures.
30	0,2338	17,42	7,45	K. Comme n ^o 29; pourtant chauffé pendant 10 heures.
31	0,2160	16,32	7,56	K. Comme n ^o 29; pourtant chauffé pendant 24 heures.
32	0,2713	19,80	7,30	K. Vert pur après 7 heures d'ébullition. Durée totale d'ébullition 36 heures.
33	0,3178	24,85	7,82	G.-A. Durée d'ébullition 2 1/2 heures.
34	0,1844	14,45	7,84	G.-A. Comme n ^o 33.
35	0,2273	17,85	7,85	K.-G.-A. Chauffé d'après <i>Kjeldahl</i> pendant 34 heures, puis suivant G.-A. pendant 2 heures.

Dans les essais n^{os} 28 à 31 on a mis en œuvre 10 cc., dans les autres 20 cc. d'acide sulfurique concentré.

(d). Éther triméthylène-diphtalimidomalonique,

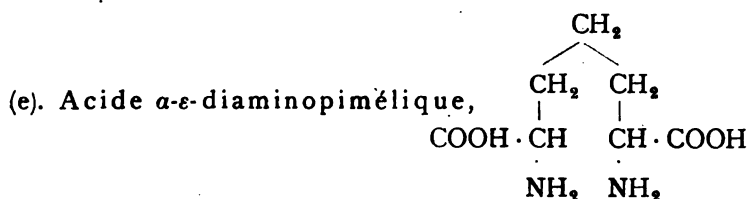


On a préparé ce composé en traitant d'une manière convenable de l'éther phtalimido-sodomalonique par le bromure de triméthylène¹⁾. Un dosage d'après Dumas donna 4,43 % d'azote.

Dosages d'azote (calculé 4,32 %).

N ^o des essais	Poids de la sub- stance	Proportion de l'ammo- niaque cor- respondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Propor- tion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
36	0,3982	16,22	4,07	K. Vert pur après 7 heures d'ébullition. Durée totale de l'ébullition 7 heures.
37	0,4045	16,42	4,06	K. Comme n ^o 36. Pourtant chauffé pendant 9 heures.
38	0,3456	13,88	4,02	K. Comme n ^o 36. Pourtant chauffé pendant 10 heures.
39	0,4336	17,56	4,05	K. Comme n ^o 36. Pourtant chauffé pendant 12 1/2 heures.
40	0,4156	16,62	4,00	K. Comme n ^o 36. Pourtant chauffé pendant 24 heures.
41	0,4807	20,41	4,25	G.-A. Durée de l'ébullition 2 1/2 heures.

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 147 (Communication préliminaire).



On prépara cet acide en partant de l'éther triméthylène-diphthalimidomalonique nommé ci-dessus, par saponification au moyen d'hydroxyde de baryum, puis évaporation par l'acide chlorhydrique¹⁾. Pour quelques-uns des essais réunis ci-dessous en forme de tableau, on a employé des quantités pesées d'avance de l'acide, pour d'autres une solution, préparée comme dans le cas de la pyridine, de l'acide dans de l'acide sulfurique étendu, solution

Dosages d'azote (calculé 14,76 %).

N° des essais	Poids de la substance	Proportion de l'ammoniaque correspondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Proportion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
42	0,1511	20,80	13,77	K. Durée de l'ébullition 3 heures.
43	0,1473	19,85	13,48	K. — — — 6 —
44	0,1473	20,15	13,68	K. — — — 12 —
45	0,1471	20,00	13,60	K. — — — 18 —
46	0,1473	21,50	14,60	G. — — — 6 —
47	0,1473	21,45	14,56	G. — — — 12 —
48	0,1338	19,45	14,54	G. — — — 18 —
49	0,1473	21,55	14,63	G. — — — 24 —
50	0,1404	20,45	14,57	G.-A. — — — 2½ —
51	0,1473	21,45	14,56	G.-A. — — — 2½ —
52	0,1247	18,20	14,59	G.-A. — — — 3 —
53	0,1473	21,60	14,66	G.-A. — — — 4 —
54	0,1473	21,45	14,56	G.-A. — — — 8 —
55	0,1382	19,55	14,15	K.—G.-A. Chauffé d'après K. pendant 16 heures, puis d'après G.-A. pendant 2 heures.
56	0,1319	19,30	14,63	K.—G.-A. Chauffé d'après K. pendant 16 heures, puis d'après G.-A. pendant 4 heures.
57	0,1473	20,75	14,09	K.—G.-A. Chauffé d'après K. pendant 18 heures, puis d'après G.-A. pendant 2 heures.
58	0,1473	21,55	14,63	K.—G.-A. Chauffé d'après K. pendant 18 heures, puis d'après G.-A. pendant 4 heures.
59	0,1473	21,45	14,56	K.—G.-A. Chauffé d'après K. pendant 18 heures, puis d'après G.-A. pendant 8 heures.

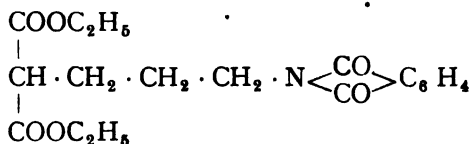
¹⁾ A l'endroit cité.

qui contenait 0^{gr},1473 de l'acide par 10 cc. Un chauffage en présence d'acide sulfurique n'a pas donné de carbonisation. Tous les dosages d'après le procédé ordinaire de Kjeldahl (n^{os} 42 à 45) furent effectués avec 10 cc. d'acide sulfurique concentré, et pour parfaire l'oxydation subséquente par le permanganate potassique on a dû en employer des quantités notables avant l'apparition du dépôt vert foncé sale. Tous les autres dosages furent effectués avec 20 cc. d'acide sulfurique concentré.

Il ressort de ces tableaux que les trois derniers corps (acide lysurique, éther triméthylène-diphthalimidomalonique et acide α - ε -diaminopimélique), susceptibles de former, par ébullition en présence d'acide sulfurique concentré, un noyau pipéridique, avec élimination d'ammoniaque, se comportent comme la pipéridine elle-même: par la méthode ordinaire de Kjeldahl pour le dosage de l'azote, ils donnent des résultats plus bas que par les modifications Gunning ou Gunning-Arnold.

Si l'on substitue un groupe CO à un groupe CH₂ de l'anneau pipéridique, cet anneau devient plus facilement décomposable; c'est ainsi que la pipéridone peut être analysée par la méthode ordinaire de Kjeldahl, et il en est de même pour l'acide γ -aminopropyle-malonique, qui par simple distillation abandonne l'acide carbonique et l'eau, avec formation de pipéridone. Il nous semble d'autant plus étonnant que, même en soumettant à une ébullition très prolongée suivant le procédé Kjeldahl la matière première destinée à la préparation dudit acide aminé, c'est-à-dire l'éther γ -phtalimidopropyle-malonique préparé primitivement par S. Gabriel¹⁾, elle donne des résultats un peu trop bas.

(f). Éther γ -phtalimidopropyle-malonique,



Cet éther a été préparé par le procédé de Gabriel.

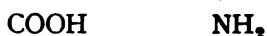
¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 23, 1767 (1890), et 24, 1364 (1891).

Dosages d'azote (calculé 4,04 %).

N° des essais	Poids de la substance	Proportion de l'ammoniaque correspondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Proportion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
60	0,3711	13,14	3,54	K. Durée de l'ébullition 5 heures.
61	0,2329	8,75	3,76	K. — — — 16 —
62	0,2770	10,85	3,92	K. — — — 24 —
63	0,7451	30,49	4,09	G.-A. — — — 2 —



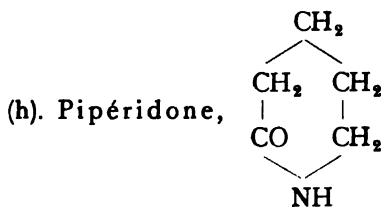
(g). Acide γ -aminopropyle-malonique, $\text{CH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2$



On a préparé cet acide en partant de l'éther sus-mentionné, en décomposant avec de l'hydroxyde de baryum et traitant par l'acide chlorhydrique d'une manière convenable.

Dosages d'azote (calculé 8,71 %).

N° des essais	Poids de la substance	Proportion de l'ammoniaque correspondante à — cc. de solution d'hyposulfite	Proportion de l'azote	Méthode employée. Durée de l'ébullition.
	gr.	cc.	%	
64	0,1694	14,60	8,62	K. Durée de l'ébullition 3 heures.
65	0,1473	12,80	8,69	K. — — — 6 —
66	0,1488	12,90	8,67	K. — — — 10 —
67	0,2057	17,90	8,70	K. — — — 21 —
68	0,1714	14,95	8,72	G.-A. — — — 2 $\frac{1}{2}$ —



On prépara ce composé en chauffant l'acide γ -aminopropyle-malonique mentionné plus haut dans un ballon à fractionner plongé dans le bain d'huile, opération qui fit se dégager de

ÉTUDES SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS

PAR

S. P. L. SØRENSEN.

VI. Dédoublément de l'acide ornithurique racémique en formes optiquement actives.

Dans un mémoire publié il y a deux ans¹⁾ je signalais certaines divergences entre l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique obtenu par voie de synthèse, d'un côté, et, de l'autre, l'acide ornithurique tiré de produits naturels. Sans doute, ces divergences étaient toutes de nature à faire présumer que les deux acides indiqués étaient l'un à l'autre ce qu'une combinaison racémique est à la modification optiquement active correspondante; mais l'exactitude de cette conjecture n'avait pas encore été vérifiée. C'est ce qui fait l'objet du présent mémoire.

Si l'on traite de l'acide ornithurique racémique (c'est-à-dire de l'acide α - δ -dibenzoyle-diaminovalérique préparé par voie de synthèse) par une quantité équivalente d'un alcaloïde (je me suis servi à cet effet de cinchonine, morphine, strychnine et brucine) et par une quantité convenable d'eau chaude, on parvient aisément à former des solutions d'ornithurates racémiques des alcaloïdes, solutions qui, évaporées et réfrigérées convenablement, font tomber des dépôts huileux constitués de l'un des ornithurates optiquement actifs d'alcaloïdes, à l'état plus ou moins pur.

Ce n'est qu'en employant l'alcaloïde brucine que j'ai réussi à obtenir sous la forme cristalline le dépôt constitué en ce cas de l'ornithurate droit de brucine; dans tous les autres cas

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 58 (1902).

je n'ai obtenu que des huiles aptes à former, en se desséchant, des masses résineuses, plus ou moins friables. C'est ainsi que, en partant directement de l'acide ornithurique racémique, il n'a pas été possible de préparer à l'état pur et cristallin le sel d'alkaloïde de la modification gauche; au contraire, en prenant comme point de départ l'acide ornithurique gauche passablement pur retiré de l'eau-mère de l'ornithurate droit de brucine, j'ai réussi sans trop de difficulté à préparer l'ornithurate gauche de cinchonine pur et à l'état cristallin.

En partant des sels d'alkaloïdes, je pus éliminer l'alkaloïde à l'aide d'hydroxyde de sodium, et en précipitant par l'acide chlorhydrique la solution ainsi obtenue j'obtins alors l'acide ornithurique. L'acide ornithurique droit ainsi préparé se comportait tout à fait (conférez pourtant le pouvoir rotatoire spécifique, p. 221) de la même manière que celui tiré de produits naturels et, à l'exception du signe du pouvoir rotatoire, l'acide gauche offrait exactement les mêmes propriétés. On trouvera vers la fin de ce mémoire un exposé sommaire de cet état de choses.

Il s'ensuit donc qu'on est parvenu

1^o à réaliser la synthèse complète tant de l'acide ornithurique droit que de l'acide gauche, — et

2^o à établir l'identité de l'acide α - δ -dibenzoyl-diaminovalérique droit avec l'acide ornithurique naturel.

1. Ornithurate droit de brucine.



On traita $\frac{1}{10}$ molécule-gramme (34 gr.) d'acide ornithurique racémique et $\frac{1}{10}$ molécule-gramme (46^{gr},6) de brucine renfermant de l'eau de cristallisation dans un ballon de la capacité de 5 l. et contenant 3 l. d'eau. On chauffa au bain-marie pendant 2 heures, en agitant bien. Presque le tout était alors entré en dissolution; toutefois il se trouvait au fond du matras une petite quantité d'une masse résineuse qui, chauffée ultérieurement, finit par se cristalliser. Un chauffage ultérieur de 4 heures fit augmenter d'une manière appréciable la proportion de la masse cristalline, et même sur les côtés du ballon on observa un commencement de cristallisation. On transvasa alors le tout dans une capsule en porcelaine d'assez grande capacité et rinça le ballon deux ou trois fois à l'eau chaude. On laissa reposer jus-

qu'au lendemain, en ayant soin d'agiter fréquemment; il s'était alors formé un joli dépôt cristallin qui, au microscope, offrait l'apparence d'agglomérations de cristaux lamellés assez épais. On essora à la trompe et lava 3 fois à l'eau froide le dépôt, qui était faiblement coloré ainsi que l'eau-mère. Après dessiccation à l'air, le poids était de 28^{gr},5.

Évaporées au bain-marie jusqu'à un volume de 1¹/₄ à 1¹/₂ l., puis abandonnées à elles-mêmes, les eaux mère et de lavage fournirent un nouveau dépôt qui, cependant, était en partie huileux. Quant au produit principal, on le purifia par recristallisation. Par traitement dans une capsule, placée au bain-marie avec 3 + 1 + 1¹/₂ + 1¹/₂ l. d'eau préalablement portée à l'ébullition, le tout entra en dissolution, sauf quelques flocons bruns, qu'on sépara par filtration à chaud. Ayant laissé le liquide filtré dans des capsules de porcelaine jusqu'au lendemain, on obtint de nouveau un joli dépôt cristallin et presque incolore; le microscope révéla de beaux prismes incolores à six pans, le plus souvent surmontés de pyramides, souvent aussi aplatis et présentant la forme de feuillets longs et assez épais, irréguliers, hexagonaux. Le dépôt qui, après essorage, lavage et dessiccation à l'air, accusait un poids de 19 gr., fut recristallisé encore une fois de la même manière; on en récupéra 13^{gr},3.

Les autres détails sont consignés dans le schéma des fractionnements (v. p. 213), qui montre nettement les procédés par lesquels on a obtenu les différentes fractions.

On a éliminé la brucine de chaque fraction en chauffant avec de l'eau et avec une proportion d'hydroxyde de sodium dépassant un peu celle requise pour faire précipiter la brucine; ensuite, on a réfrigéré à l'eau glacée, essoré à la trompe et lavé à l'eau froide la brucine déposée. On fit refroidir à la glace la liqueur alcaline filtrée, et l'on fit précipiter l'acide ornithurique au moyen d'acide chlorhydrique; après un abandon jusqu'au lendemain, on filtra et débarrassa l'acide ornithurique de l'acide chlorhydrique par des lavages à l'eau froide, puis plusieurs fois à l'eau chaude. Dans l'eau-mère de l'acide ornithurique on put toujours, au moyen des réactifs généraux des alcaloïdes, constater la présence d'une petite quantité de brucine. Afin de l'en débarrasser, et pour plus de sûreté, on fit chaque fois redissoudre l'acide ornithurique dans une lessive de soude, et on le précipita, puis lui fit subir le même traitement que la première fois. Dans

cette seconde eau-mère, on ne put ordinairement reconnaître qu'une trace de brucine.

Le poids des portions d'acide ornithurique retirées des diverses fractions et séchées à l'air, se trouve indiqué dans le schéma. Desséchées dans le vide à 80°, toutes les préparations séchées à l'air perdirent un peu de leur poids (0,1 à 0,4%).

On détermina, en lumière du sodium (à 20°), par le procédé habituel, le pouvoir rotatoire dans une solution légèrement alcaline des préparations ainsi séchées; dans l'avant-dernière ligne du schéma on trouvera les valeurs établies de $[\alpha]_D^{20}$. La rotation spécifique de l'acide ornithurique dépend essentiellement de la concentration; c'est pourquoi, comme on le verra plus loin (p. 220), j'ai déterminé la déviation que donne l'acide ornithurique droit dans des solutions faiblement alcalines à 20, 10 et 5%, et en partant des valeurs ainsi trouvées de $[\alpha]_D^{20}$, j'ai pu déterminer graphiquement et avec une exactitude suffisante la valeur qu'il faut y attribuer pour toutes les concentrations intermédiaires. La dernière ligne du schéma indique sous la désignation $\ast[\alpha]_D^{20}$ calculé la valeur de $[\alpha]_D^{20}$ qui, conformément à ce que je viens de dire, correspond à la concentration employée et à laquelle on serait arrivé, si l'acide ornithurique en jeu avait été un composé pur respectivement droit ou gauche.

187,5022 de fraction A dissous dans 2 cc, 5 de lessive de soude 2. normale rempli de l'eau jusqu'à un volume total de 20 cc., m'a donné une déviation en lumière du sodium dans un tube de 2 décimètres à 20° de + 1° 26'; donc $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ} 54$; calculé + 9° 59.

187,1958 de fraction B (dissous dans 2 cc. de lessive de soude + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de + 1° 10'; $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ} 76$; calculé + 9° 80.

087,8784 de fraction C (dissous dans 1 cc, 5 de lessive de soude + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de + 53'; $[\alpha]_D^{20} = + 10^{\circ} 05$; calculé + 10° 04.

287,2088 de fraction D (dissous dans 3 cc, 7 de lessive de soude + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de + 2° 3'; $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ} 28$; calculé + 9° 17.

087,7134 de fraction E (dissous dans 1 cc, 2 de lessive de soude + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de + 40'; $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ} 35$; calculé + 10° 15.

187,3201 de fraction F (dissous dans 2 cc, 2 de lessive de soude + de l'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de + 1° 14'; $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ} 34$; calculé + 9° 70.

187,8043 de fraction G (dissous dans 3 cc. de lessive de soude + de l'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de + 1° 3'; $[\alpha]_D^{20} = + 5^{\circ} 82$; calculé + 9° 40.

$1^{\text{er}}, 8588$ de fraction H (dissous dans 3 cc. de lessive de soude + de l'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 1^{\circ} 34'$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \div 8^{\circ}, 43$; calculé $\div 9^{\circ}, 36$.

Il ressort du schéma que même le dépôt formé en premier lieu ($28^{\text{er}}, 5$) était constitué par un composé droit presque parfaitement pur; car ce n'est que dans la fraction E, soit la dernière de celles qui proviennent de ce dépôt, qu'on retrouve un peu du composé racémique. Par conséquent, comme on devait s'y attendre, le dépôt recristallisé (19 gr.) est parfaitement pur; car tous les produits obtenus par une nouvelle recristallisation de ce dépôt (les fractions A, B et C) possèdent le même pouvoir rotatoire spécifique. Sans doute les fractions G et H ne contiennent pas de composé gauche pur; mais on reconnut que l'acide ornithurique qu'elles fournissaient était un excellent point de départ pour la préparation de l'ornithurate gauche de cinchonine (voir plus bas).

Le total de l'acide ornithurique racémique traité comme précédemment décrit, se montait à 80 gr. A partir de cette quantité on obtint:

a° de l'acide ornithurique droit complètement exempt d'acide racémique et correspondant aux fractions A, B et C	17 ^{er} , 1
b° de l'acide ornithurique droit presque exempt d'acide racémique correspondant aux fractions D, E og F	7 ^{er} , 8
c° des mélanges d'acides racémique et gauche, correspondant aux fractions G et H.....	39 ^{er} , 0
Total...	63 ^{er} , 9
soit environ 80% de la matière première.	

J'ajouterai encore quelques remarques relatives à l'ornithurate droit de brucine. Nous avons vu que ce sel est assez difficilement soluble dans l'eau, même chaude; dans l'alcool il est assez facilement soluble à froid et très soluble à chaud, tandis que dans l'éther il se dissout difficilement. Séché à l'air, le sel renferme environ 1 molécule d'eau de cristallisation, qu'il abandonne dans le vide à 70°. Laisse au-dessus d'eau, il l'absorbe de nouveau.

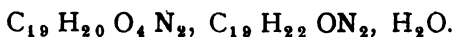
Exposés dans le vide sulfurique, $1^{\text{er}}, 0052$ du sel cédèrent très lentement et incomplètement leur eau de cristallisation; après un abandon subséquent dans le vide à 70°, on constata du jour au lendemain que le poids restait constant; la perte était de $0^{\text{er}}, 0263$ (2,62%); abandonné sur de l'eau, le sel déshydraté en réabsorba

pendant 24 heures 0^{gr},0256. Un séjour prolongé sur l'eau ne changea pas le poids du sel (teneur en eau calculée pour 1 mol. d'eau 2,39⁰/0).

0^{gr},2577 de sel déshydraté donnèrent, dans un dosage par la méthode Dumas, 18^{cc},0 d'azote à 21⁰ et sous 738^{mm},3 de pression, correspondant à 7,68 % d'azote (calculé 7,65⁰/0).

Le sel déshydraté fondit nettement à 135—136⁰ (corr.); le sel contenant de l'eau offrit à peu près le même point de fusion, mais avec moins de netteté.

2. Ornithurate gauche de cinchonine.



On pila bien dans un mortier 21^{gr},6 d'acide ornithurique (mélange des acide racémique et gauche des fractions G et H, p. 214) avec 19^{gr},5 de cinchonine (calculé pour molécules égales 18^{gr},7). Puis dans un ballon de 5 l. on mit en suspension le mélange dans 1/2 l. d'eau froide, et l'on versa, en agitant constamment, de l'eau bouillante jusqu'à un volume d'environ 4 1/2 l., ce qui fit entrer en dissolution la majeure partie du mélange. Après avoir chauffé 5 à 6 heures durant au bain d'eau bouillante, et en agitant fréquemment, on filtra la partie restée indissoute (fraction E du schéma p. 217).

Refroidi, le liquide filtré montra bientôt un trouble laiteux, nettement huileux (fraction D du schéma p. 217); cependant en continuant de faire refroidir, tout en agitant énergiquement, on vit bientôt se produire un dépôt cristallin. Dès l'apparition de celui-ci, on transvasa le liquide et les cristaux en suspension dans un autre becherglas, où la cristallisation s'acheva du jour au lendemain. Le joli dépôt blanc, très volumineux, présentait au microscope des faisceaux de cristaux aciculaires, quelques-uns effilés, d'autres plus courts et plus épais. On l'essora à la trompe, puis le lava 3 fois à l'eau froide. Rendement 20^{gr},2 de sel de cinchonine. Les eaux mère et de lavage fournirent la fraction F (v. le schéma p. 217).

De cette manière on traita en tout 39^{gr},0 d'acide ornithurique (v. p. 214), qui fournirent un total de 34^{gr},2 d'ornithurate gauche de cinchonine.

Chauffé avec de l'eau au bain-marie bouillant, le sel de cinchonine fondit, de sorte qu'on put difficilement le faire entrer en dissolution. Il en fut de même quand on y versa de l'eau bouillante. C'est pourquoi on le fit recristalliser de la façon

suivante: Dans un ballon de 5 l. on mit en suspension le sel dans $\frac{1}{2}$ l. d'eau froide; puis, en secouant énergiquement, on y ajouta de l'eau bouillante, jusqu'à ce que presque tout fût entré en dissolution. Ensuite on filtra et fit entrer le reste en dissolution d'une façon semblable. Comme un échantillon prélevé sur la solution, dont le volume total était de 5 à 6 l., ne fournit par réfrigération qu'un dépôt insignifiant, on fit évaporer toute la solution au bain-marie jusqu'à ce qu'on aperçût à la surface une pellicule à demi cristalline; le volume était alors d'environ 3 l.

Après avoir laissé refroidir lentement à l'air, mais en agitant constamment, on eut une augmentation du dépôt moitié solide, moitié huileux. Alors la cristallisation proprement dite commença. En ce moment on transvasa le liquide ainsi que les cristaux qui venaient de s'y déposer, dans un verre à pied où la cristallisation se compléta du jour au lendemain. (La masse à demi liquide et adhérente aux parois de la capsule, constitue la fraction B du schéma p. 217). Le dépôt fort volumineux qui s'était formé, présentait à l'œil nu l'aspect d'écailles à éclat soyeux; en l'examinant au microscope, on vit qu'il se composait de prismes bien développés longs et étroits, souvent obliquement tronqués. On les filtra à la trompe et les lava trois fois à l'eau froide. Desséché à l'air, le sel pesait 16 gr. (fraction A du schéma p. 217); les eaux mère et des lavages donnèrent la fraction C (v. le schéma p. 217).

En partant des différentes fractions, on prépara et analysa l'acide ornithurique comme décrit précédemment pour l'ornithurate droit de brucine (v. p. 211).

2^{gr},3691 de fraction A (dissous dans 4 cc. de lessive de soude 2. normale + de l'eau jusqu'à un volume de 20 cc.) donnèrent une déviation¹⁾ de $\div 2^{\circ} 8'$; donc $[\alpha]_D^{20} = \div 9^{\circ},00$; calculé $\div 9^{\circ},10$. Après dilution de 10 cc. de cette solution jusqu'à un volume de 20 cc., la déviation était de $\div 1^{\circ} 10'$; donc $[\alpha]_D^{20} = \div 9^{\circ},85$; calculé $\div 9^{\circ},81$.

1^{gr},6467 de fraction B (dissous dans 2^{cc},8 de lessive de soude 2 norm. + de l'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 1^{\circ} 33'$; $[\alpha]_D^{20} = \div 9^{\circ},41$; calculé $\div 9^{\circ},50$.

1^{gr},1582 de fraction C (2^{cc},0 de lessive + de l'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 1^{\circ} 6'$; $[\alpha]_D^{20} = \div 9^{\circ},50$; calculé $\div 9^{\circ},82$.

1^{gr},1825 de fraction D (2^{cc},0 de lessive + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 1^{\circ} 3'$; $[\alpha]_D^{20} = \div 8^{\circ},88$; calculé $\div 9^{\circ},81$.

1^{gr},3159 de fraction E (2^{cc},2 de lessive + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 57'$; $[\alpha]_D^{20} = \div 7^{\circ},22$; calculé $\div 9^{\circ},70$.

¹⁾ Dans cet essai de polarisation comme dans tous ceux qui précèdent et suivent, on s'est servi d'un tube de 2 décimètres de longueur; température 20°.

obtenu à partir de 39 gr. d'un mélange des acides ornithuriques gauche et racémique.

34 ^{gr} ,2 de sel de cinchonine cristallisé	Séparé en forme cristalline	Déposé à l'état huileux	Eau-mère	Précipité à l'état huileux	Non dissous à la paration	Eau-mère
Fraction	A	B	C	D	E	F
Poids de l'acide ornithurique en grammes ...	7,6	2,9	5,5	1,2	2,3	11,2
[a] _D ²⁰ trouvé	a ⁰ ÷ 9 ⁰ ,00, b ⁰ ÷ 9 ⁰ ,85	÷ 9 ⁰ ,41	÷ 9 ⁰ ,50	÷ 8 ⁰ ,88	÷ 7 ⁰ ,22	÷ 4 ⁰ ,18
[a] _D ²⁰ calculé	a ⁰ ÷ 9 ⁰ ,10, b ⁰ ÷ 9 ⁰ ,81	÷ 9 ⁰ ,50	÷ 9 ⁰ ,82	÷ 9 ⁰ ,81	÷ 9 ⁰ ,70	÷ 9 ⁰ ,20

2^{gr},1532 de fraction F (3^{cc},6 de lessive + de l'eau à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 54'$; $[\alpha]_D^{20} = \div 4^0,18$; calculé $\div 9^0,20$.

Il ressort du schéma de fractionnements (p. 217) que même le dépôt fourni par la première cristallisation (34^{gr},2) était une combinaison gauche presque pure; car, par recristallisation de ce dépôt, l'eau-mère même a donné un acide gauche presque pur. De plus, le schéma montre que les rendements furent comme suit:

a ^o de l'acide ornithurique gauche complètement exempt d'acide racémique (fractions A et B)	10 ^{gr} ,5
b ^o de l'acide gauche presque exempt d'acide racémique (fraction C)	5 ^{gr} ,5
c ^o des mélanges des acides racémique et gauche (fraction D, E et F)	14 ^{gr} ,7
	<hr/>
Total	30 ^{gr} ,7

En y ajoutant

l'acide ornithurique droit obtenu (17 ^{gr} ,1 + 7 ^{gr} ,8, v. p. 214)	24 ^{gr} ,9
et l'acide obtenu en réunissant toutes sortes de restes recueillis au cours de la préparation	12 ^{gr} ,2

l'on obtient un rendement total de 67^{gr},8 soit environ 85 % de la matière première (80 gr., v. p. 214).

J'ajouterai quelques remarques concernant le sel de cinchonine de l'acide ornithurique gauche. Nous avons vu dans ce qui précède que ce sel se dissout assez difficilement dans l'eau, même à chaud; il est très facilement soluble dans l'alcool, même froid, tandis que l'éther le dissout avec peine.

Le sel, séché à l'air, renferme près de 1 molécule d'eau de cristallisation, qu'il abandonne assez facilement en séjournant dans le vide au-dessus d'acide sulfurique concentré. Placé sur de l'eau, il l'absorbe de nouveau.

1^{gr},0247 du sel perdirent dans le vide sulfurique pendant 96 heures, en tout, 0^{gr},0227 (2,22 %; la théorie exige 2,76 % pour 1 molécule d'eau); un séjour ultérieur dans le vide tant au-dessus de l'acide sulfurique concentré qu'à 70° ne fit pas augmenter la perte. Placé dans l'air humide jusqu'à ce que le poids n'augmentât plus, le sel absorba 0^{gr},0261 d'eau, ce qui correspond à peu de chose près à 1 molécule d'eau.

Dans un dosage d'après Dumas, 0^{gr},2339 de sel déshydraté donnèrent, à 20°₂ et sous 750^{mm},8 de pression, 18^{cc},8 d'azote, correspondant à 9,02 % d'azote (calculé 8,85 %).

Le sel déshydraté fondit nettement à $154-155^{\circ}$ (corr.). Le sel hydraté avait à peu près la même température de fusion; toutefois, celle-ci ne put être déterminée aussi exactement que dans le cas du sel anhydre.

3. Acides ornithuriques droit et gauche.

Pour tous les essais exposés dans ce qui va suivre, je me suis adressé seulement aux acides respectivement droit et gauche complètement exempts d'acide racémique, c'est-à-dire, en ce qui concerne l'acide droit, aux $17^{\text{er}}, 1$ mentionnés à la page 214, et pour l'acide gauche aux $10^{\text{er}}, 5$ indiqués à la page 218. Avant de m'en servir, je les ai fait recristalliser l'un et l'autre dans de l'alcool absolu.

On fit dissoudre $15^{\text{er}}, 4$ d'acide ornithurique droit dans $180 + 15 + 15$ cc. d'alcool absolu chaud. On sépara, par filtration de la solution, quelques rares flocons. Agitée ensuite, la liqueur laissa tomber, avant même qu'elle fût refroidie, un dépôt abondant et volumineux qui, sous le microscope, affectait exclusivement la forme de cristaux aciculaires. Après repos jusqu'au lendemain, on filtra à la trompe, lava le dépôt 3 fois à l'alcool absolu, et enfin on le dessécha à l'air.

Rendement en acide ornithurique droit pur: $12^{\text{er}}, 6$.

En opérant d'une manière semblable, on obtint, à partir de $8^{\text{er}}, 6$ d'acide gauche brut et en recristallisant dans l'alcool absolu, $6^{\text{er}}, 8$ d'acide ornithurique gauche pur présentant exactement le même aspect que le composé droit.

Abstraction faite du signe du pouvoir rotatoire, les acides ornithuriques droit et gauche se comportaient d'une manière tout à fait identique. Entre les acides optiquement actifs et l'acide racémique, tous les trois à l'état libre, il fut également impossible de découvrir des différences considérables: comme on va le voir, il ne s'en produisit que dans les produits de transformation et dans les sels. Toutefois, entre les acides libres optiquement actifs et l'acide racémique libre, je vais signaler ici quelques divergences, peu importantes, il est vrai, mais qui se manifestaient toujours d'une façon constante.

J'ai montré dans une étude antérieure¹⁾ qu'à l'état brut l'acide racémique séché à l'air ne perdit que très peu de son

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 47 (au bas de la page) (1902).

poids dans le vide à 120° , alors que les produits recristallisés dans l'alcool, puis séchés à l'air, perdirent $\frac{1}{2}$ à $1\frac{1}{2}$ % de leur poids lorsqu'on leur fit subir une dessiccation dans le vide à 120° . D'un autre côté, pour les acides ornithuriques optiquement actifs, c'était l'inverse: séchés à l'air, les acides bruts, c'est-à-dire ceux précipités en milieu alcalin par un excès d'acide chlorhydrique, perdirent toujours, dans le vide à 80° , des quantités d'un poids appréciable (0,1 à 0,4 %), tandis que la diminution de poids correspondante des acides optiquement actifs recristallisés dans l'alcool ne dépassait jamais 0,05 %.

Les acides ornithuriques sont presque insolubles dans l'eau froide et très difficilement solubles dans l'eau chaude. On traita pendant deux à trois heures, en agitant à diverses reprises, 0^{gr},1 d'acide ornithurique droit avec 20 cc. d'eau dans une éprouvette placée dans de l'eau bouillante. Filtrée rapidement à chaud, la solution laissa tomber presque instantanément un beau dépôt cristallin très volumineux, constitué d'acide ornithurique droit vu au microscope, il présentait exclusivement de longues aiguilles aplaties. Il en fut de même pour l'acide ornithurique gauche; mais l'acide ornithurique racémique se déposait beaucoup plus lentement; aussi son dépôt était-il moins volumineux et présentait au microscope des aiguilles plus courtes et plus larges.

L'acide ornithurique droit fondit à $188-189^{\circ}$ (corr.), l'acide ornithurique gauche à 189° (corr.), tandis que l'acide ornithurique naturel fond d'après Jaffé¹⁾ vers 182° (non corr.), suivant Schulze et Winterstein²⁾ vers 184° ; l'acide ornithurique racémique est fusible entre 187 et 188° (corr.³⁾).

On constata que la rotation spécifique ($[\alpha]_D^{\circ}$) du sel sodique de l'acide ornithurique droit en solution faiblement alcaline est de
+ $8^{\circ},50$ (la solution contenait environ 20 % d'acide ornithurique),

+ $9^{\circ},29$ (la solution contenait env. 10 % d'acide ornithurique) et
+ $9^{\circ},95$ (la solution contenait env. 5 % d'acide ornithurique).

La rotation spécifique dépend donc jusqu'à un certain degré de la concentration de la solution.

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 10, 1927 (1877).

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 26, 4 (1898).

³⁾ E. Fischer: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 463 (1901), et S. P. L. Sørensen: Ces Comptes-rendus 6, 46 (1902).

Pour le sel sodique de l'acide ornithurique gauche, on trouva dans les mêmes conditions:

$\div 9^{\circ},22$ (la solution contenait env. 10 % d'acide ornithurique).

Enfin, le sel potassique de l'acide ornithurique droit donna en solution légèrement alcaline

$+ 8^{\circ},87$ (la solution contenait env. 10 % d'acide ornithurique).

Le sel potassique a donc un pouvoir rotatoire moindre que celui du sel sodique.

La seule détermination publiée jusqu'à ce jour du pouvoir rotatoire de l'acide ornithurique naturel est due à E. Fischer, qui a examiné une des préparations de Jaffé. Fischer¹⁾ a constaté que la rotation spécifique du sel potassique en solution légèrement alcaline est de $+ 7^{\circ},85$ (la solution contenait environ 10 % d'acide ornithurique). Le chiffre est beaucoup plus bas que celui que je viens d'indiquer. J'ai lieu de croire que cette divergence est due à une teneur en acide ornithurique racémique dans la préparation examinée par Fischer; car, vu l'accord, presque complet sous tous les autres rapports, de l'acide ornithurique naturel avec l'acide ornithurique droit synthétiquement préparé, la constitution de l'acide ornithurique naturel ne peut guère faire de doute.

4^{gr},0192 d'acide ornithurique droit pur (dissous dans 6^{cc},5 de lessive de soude 2. normale + d'eau jusqu'à 20 cc.) provoquèrent une déviation²⁾ de $+ 3^{\circ} 25'$. $[\alpha]_D^{20} = + 8^{\circ},50$.

On dilua d'eau 10 cc. de cette solution jusqu'à un volume de 20 cc. La rotation fut alors $+ 1^{\circ} 52'$. $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ},29$.

10 cc. de cette dernière solution furent étendus d'eau jusqu'à 20 cc. La rotation fut alors $+ 1^{\circ}$. $[\alpha]_D^{20} = + 9^{\circ},95$.

2^{gr},0598 d'acide ornithurique gauche pur (dissous dans 3^{cc},3 de lessive + d'eau jusqu'à 20 cc.) donnèrent une déviation de $\div 1^{\circ},54'$. $[\alpha]_D^{20} = \div 9^{\circ},22$.

2^{gr},0296 d'acide ornithurique droit pur (dissous dans 3^{cc},3 de solution d'hydroxyde de potassium 2. normale + d'eau jusqu'à 20⁰) donnèrent une déviation de $+ 1^{\circ} 48'$. $[\alpha]_D^{20} = + 8^{\circ} 87$.

0^{gr},1571 d'acide ornithurique droit pur donnèrent 0^{gr},3856 d'acide carbonique (66,94 % de carbone) et 0^{gr},0855 d'eau (6,09 % d'hydrogène).

0^{gr},1671 d'acide ornithurique gauche pur donnèrent 0^{gr},4114 d'acide carbonique (67,14 % de carbone) et 0^{gr},0919 d'eau (6,15 % d'hydrogène).

0^{gr},1546 d'acide ornithurique droit pur donnèrent, dans un dosage d'azote par la méthode Kjeldahl, une quantité d'ammoniaque correspondant à 12^{cc},65 de solution d'hyposulfite ⁿ/14,04 (8,18 % d'azote).

¹⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 456 (1901).

²⁾ V. la note à la p. 216.

0^{gr},1426 d'acide ornithurique gauche pur donnèrent une quantité d'ammoniaque correspondant à 11^{cc},75 de solution d'hyposulfite (8,24 % d'azote).

		Calculé	Trouvé	
			Acide ornithurique droit	gauche
C ₁₉	228,00	67,01	66,94	67,14
H ₂₀	20,16	5,93	6,09	6,15
O ₄	64,00	18,81		
N ₂	28,08	8,25	8,18	8,24
		340,24	100,00	

4. Ornithurates droit et gauche de chaux.

En appliquant le mode d'obtention de l'acide ornithurique racémique, procédé décrit antérieurement¹⁾, on prépara les sels de calcium à partir de $\frac{1}{100}$ mol.-gr. (1^{gr},7) respectivement d'acide ornithurique droit et d'acide ornithurique gauche. Dans l'un et l'autre cas les sels de calcium se précipitaient sous la forme de dépôts blancs caséux apparaissant au microscope comme des agglomérations d'aiguilles extrêmement minces (tandis que les cristaux du sel calcaire de l'acide racémique affectent des formes lamellées). On obtint, dans l'un et l'autre cas, un rendement de 1^{gr},6 de sel séché à l'air qui, de même que le sel calcaire de l'acide naturel et contrairement au sel calcaire de l'acide racémique, ne renfermait pas d'eau de cristallisation.

0^{gr},8308 d'ornithurate droit de chaux, séchés à l'air, puis abandonnés dans le vide sulfurique, ne perdirent du jour au lendemain que 0^{gr},0008, et ensuite, même en desséchant pendant deux jours consécutifs dans le vide à 120°, il n'y eut pas diminution de poids²⁾. — Il en fut de même pour l'ornithurate gauche de chaux.

Pour les analyses suivantes on employait les sels calcaires après dessiccation dans le vide sulfurique.

0^{gr},1891 d'ornithurate droit de chaux donnèrent 0^{gr},4384 d'acide carbonique (63,23 % de carbone) et 0^{gr},0950 d'eau (5,62 % d'hydrogène).

0^{gr},2201 d'ornithurate gauche de chaux donnèrent 0^{gr},5104 d'acide carbonique (63,24 % de carbone) et 0^{gr},1100 d'eau (5,59 % d'hydrogène).

0^{gr},2112 d'ornithurate droit de chaux fournirent une quantité d'ammoniaque correspondant à 16^{cc},35 de solution d'hyposulfite (7,74 % d'azote).

0^{gr},1726 d'ornithurate gauche de chaux fournirent une quantité d'ammoniaque correspondant à 13^{cc},35 de solution d'hyposulfite (7,73 % d'azote).

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 49 (1902).

²⁾ Comp., pour le sel calcaire de l'acide racémique, l'endroit cité, p. 50—52.

		Calculé	Trouvé	
			Composé droit	gauche
C ₃₈	456,00	63,46	63,23	63,24
H ₈₈	38,30	5,33	5,62	5,59
O ₈	128,00	17,81		
N ₄	56,16	7,82	7,74	7,73
Ca	40,10	5,58		
	718,56	100,00		

5. Ornithines monobenzoyliques droite et gauche.

En suivant le même procédé que celui employé pour l'acide ornithurique racémique¹⁾, on prépara les ornithines monobenzoyliques à partir respectivement de $\frac{1}{80}$ mol.-gr. (4^{gr},25) d'acide ornithurique droit et de $\frac{1}{100}$ mol.-gr. (3^{gr},4) d'acide ornithurique gauche. Toutefois, pour neutraliser l'acide chlorhydrique, on n'a pas employé l'eau ammoniacale, mais une solution d'hydroxyde de sodium, parce que l'eau-mère des ornithines monobenzoyliques devait servir à la préparation des combinaisons d'isocyanate de phényle et, partant, ne devait pas contenir d'ammoniaque.

Les deux ornithines monobenzoyliques droite et gauche se déposèrent sous la forme de précipités blancs caséeux présentant au microscope des agglomérations de fines aiguilles extrêmement minces; une nouvelle cristallisation dans de l'eau fit précipiter de nouveau ces composés sans en changer l'aspect.

Le rendement en composé dr. recristallisé fut seulement de 0^{gr},34
 — — — — — g. — — — — — 0^{gr},22

Les composés optiquement actifs cristallisent donc sous forme de fines aiguilles, exactement comme indiqué par Jaffé²⁾ et par Schulze et Winterstein³⁾ relativement au composé monobenzoylique de l'ornithine naturelle, tandis que l'ornithine monobenzoylique cristallise en lamelles⁴⁾. Conformément à cela, 0^{gr},04 de composé dr. + 0^{gr},04 de composé g., dissous dans 2 cc. d'eau chaude, puis refroidis, fournirent la combinaison racémique en quantité abondante, sous la forme d'un joli

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 52 (1902).

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 11, 408 (1878).

³⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 26, 5 (1898).

⁴⁾ E. Fischer: Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 463 (1901), et S. P. L. Sørensen: l'endroit cité.

précipité présentant même à l'œil nu de beaux feuilletts cristallins, qui sous le microscope affectaient tous la forme de lamelles quadrilatères et hexagonales bien développées.

Le point de fusion de ces composés ne peut pas être déterminé avec exactitude; les deux formes optiquement actives noircirent à 225-230°, puis suintèrent à 235-240°, pour entrer en fusion complète, avec dégagement d'air, un peu au-dessus de 240° (corr.), ce qui concorde assez bien avec les indications relatives au point de fusion de la combinaison monobenzoylique de l'ornithine naturelle (Jaffé: 225 à 230°; Schulze et Winterstein: 225 à 240°). La combinaison racémique obtenue par recristallisation de parties égales des deux formes optiquement actives, présentait un point de fusion un peu plus élevé: car elle ne suinta qu'à 240 à 245°, puis fondit complètement avec dégagement gazeux, à 250 ou 251° (corr.); pour le composé racémique pur recristallisé, j'ai antérieurement trouvé le point de fusion 255-260° (corr.).

0^{gr},0693 d'ornithine droite monobenzoylée fournirent une quantité d'ammoniaque correspondant à 8^{cc},10 d'hyposulfite (11,69 % d'azote; calculé 11,89 %).

0^{gr},0955 d'ornithine gauche monobenzoylée donnèrent une quantité d'ammoniaque correspondant à 11^{cc},40 de solution d'hyposulfite (11,94 % d'azote).

Les préparations séchées à l'air ne perdirent rien de leur poids par dessiccation dans le vide à 70°.

6. Combinaisons d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne des ornithines droite et gauche.

a. Combinaisons d'isocyanate de phényle. Pour préparer ces composés, on se servit de l'eau-mère des ornithines monobenzoylées, qu'on fit évaporer au bain-marie, puis traita par l'acide chlorhydrique concentré, tout à fait de la même manière que décrit antérieurement¹⁾ pour la combinaison racémique. Après avoir éliminé au moyen d'éther la dernière trace d'acide benzoïque, on fit subir à la matière le même traitement qu'antérieurement indiqué, c'est-à-dire par l'hydroxyde de sodium et par l'isocyanate de phényle; puis on fit précipiter par une légère sursaturation d'acide chlorhydrique. Le composé racémique se déposa alors sous forme d'un précipité blanc, caséeux, microcristallin²⁾, tandis que

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus 6, 54 (1902).

²⁾ A l'endroit cité, p. 55.

les formes optiquement actives donnèrent des précipités blancs, presque gélatineux, très volumineux, et dont l'aspect microscopique était tout à fait amorphe. Cependant, abandonnés jusqu'au lendemain avec l'eau-mère légèrement chlorhydrique, les précipités subirent des changements considérables, diminuant beaucoup de volume et prenant une consistance plutôt caséeuse; vus au microscope, ils offraient maintenant des agrégats de cristaux aciculaires. Après les avoir filtrés à la trompe, on priva les précipités de leur chlore en les lavant à l'eau froide; enfin on les dessécha à l'air.

Le composé droit fournit..... 3,5 gr.

— gauche — 2,9 —

ce qui dans les deux cas, en tenant compte des ornithines monobenzoylées déjà obtenues, se monte à plus de 85 % du calcul.

Le composé d'isocyanate de phényle racémique peut aisément se recristalliser dans l'alcool à 40 %, d'où il se dépose sous forme de jolies lamelles cristallines¹⁾. Il n'en est pas de même pour les combinaisons optiquement actives, qui ne donnent qu'une précipitation de masses gélatineuses.

0,87,2 du composé droit se sont dissous à limpidité dans 15 cc. d'alcool à 40 % portés au bain-marie. Après refroidissement, puis deux ou trois heures de repos, avec des agitations fréquentes, le composé droit commença à se déposer de nouveau en une masse gélatineuse et presque limpide comme l'eau. Même après deux jours, pendant lesquels on agitait assez fréquemment, toute la masse formait une gelée à peu près figée et dans laquelle le microscope révéla à peine un commencement de cristallisation.

0,87,2 du composé gauche, dissous dans 15 cc. d'alcool à 40 %, se comportaient de la même manière.

En chauffant ultérieurement au bain-marie, on fit redissoudre les deux composés droit et gauche. On fit des deux solutions limpides un mélange, dont le composé racémique commença à se déposer avant même que le liquide fût refroidi. Le dépôt blanc composé de beaux cristaux, présentait au microscope une aggrégation de lamelles ressemblant à celles qu'avait donné antérieurement le composé racémique. Le rendement en composé rac. était de 0,87,32.

Nous avons donc constaté que les combinaisons d'isocyanate de phényle des formes optiquement actives se cristallisent très difficilement, tout comme R. O. Herzog²⁾ l'a constaté dans le cas des combinaisons préparées par lui à partir des ornithine et

¹⁾ A l'endroit cité, p. 56.

²⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 34, 525 (1902).

lysine naturelles. J'ai pu confirmer antérieurement¹⁾ l'indication de Herzog en ce qui concerne la lysine naturelle. En même temps j'ai démontré que les ornithine et lysine racémiques fournissent des composés d'isocyanate de phényle facilement cristallisables et, conformément, C. Neuberg et M. Silbermann²⁾ ont signalé ce fait que la combinaison d'isocyanate de phényle de l'acide α - β -diaminopropionique rac. est un composé facilement cristallisable. En conséquence, il semble que tous les acides diaminocarboniques se comportent de cette manière.

Les combinaisons d'isocyanate de phényle brutes des formes optiquement actives, n'étaient pas tout à fait pures; car même après dessiccation dans le vide à 70°, opération qui leur fit perdre 0,3 à 0,4 % de leur poids, on trouva une teneur en azote inférieure aux 15,16 % indiqués par le calcul, à savoir pour le composé droit 14,67 %, pour le composé gauche 14,80 %. Par contre, les 0^{gr},32 (voir plus haut) de composé racémique obtenus par recristallisation de parties égales des deux formes optiquement actives, étaient parfaitement purs; ils accusaient une teneur en azote de 15,06 %, et leur point de fusion était compris entre 189 et 190° (corr.)³⁾.

0^{gr},1036 fournirent une quantité d'ammoniaque correspondant à 15^{cc},60 de solution d'hyposulfite (15,06 % d'azote).

b. Combinaisons d'hydantoïne. En opérant tout à fait comme décrit antérieurement⁴⁾ pour la combinaison racémique, on prépara les combinaisons d'hydantoïne optiquement actives à partir de 2 gr. de composé droit d'isocyanate de phényle et d'une même quantité du composé gauche correspondant. On obtint 1^{gr},65 du composé d'hydantoïne droit et 1^{gr},60 du composé gauche, sous forme de dépôts caséeux blancs, présentant au microscope des masses microcristallines, entremêlées de quelques rares cristaux nettement aciculaires. Les composés d'hydantoïne bruts n'étaient pas tout à fait purs: le composé droit, dont le point de fusion était compris entre 190 et 191° (corr.), accusait une teneur en azote de 15,59 % (le calcul avait indiqué 15,94 %),

¹⁾ Ces mêmes Comptes-rendus, 6, pages 55, 58 et 61 (1902).

²⁾ Ber. d. deutsch. chem. Ges. 37, 344 (1904).

³⁾ Ces mêmes Comptes-rendus, 6, 56 (1902).

⁴⁾ Ibid. 6, 56 (1902).

tandis que celle de l'autre composé, fusible à 191° (corr.) était de $15,77\%$. Ils se recristallisèrent tous deux dans l'alcool absolu chaud; refroidis ensuite, ils se précipitèrent à l'état pur sous la forme de dépôts blancs volumineux, où le microscope révéla l'existence de faisceaux d'aiguilles enchevêtrées, très fines et très minces. Selon R. O. Herzog¹⁾, le composé d'hydantoïne obtenu à partir de l'ornithine naturelle offre le même aspect. Les points de fusion des formes racémiques et de celles optiquement actives sont très rapprochés l'un de l'autre: pour celle préparée au moyen de l'ornithine naturelle, Herzog indique 191 à 192° (non corr.); ayant antérieurement trouvé celui de la combinaison rac. pure: $194-195^{\circ}$ (corr.), j'ai maintenant constaté que le composé droit pur fond à $194-195^{\circ}$ (corr.), le composé gauche pur à $195-196^{\circ}$ (corr.).

Séchés dans le vide à 70° , les composés purs ne perdirent rien de leur poids. Ils accusaient une teneur en azote de $15,92\%$ (le composé dr.) et de $15,81\%$ (le composé g.); la théorie avait donné $15,94\%$.

$0,1294$ du composé droit d'hydantoïne fournirent une quantité d'ammoniaque correspondant à $20^{\text{cc}},60$ de solution d'hyposulfite ($15,92\%$ d'azote).

$0,1800$ du composé gauche donnèrent une quantité d'ammoniaque correspondant à $28^{\text{cc}},46$ de solution d'hyposulfite ($15,81\%$ d'azote).

Il résulte de ce qui précède que l'acide ornithurique naturel pur se comporte tout à fait comme l'acide α - δ -dibenzoyle-diamino-valérique droit (laissant de côté le peu de différence de rotation spécifique, p. 221). Les deux acides doivent donc être considérés comme identiques.

Abstraction faite du pouvoir rotatoire, les différences les plus essentielles entre l'acide ornithurique racémique, d'une part et, de l'autre, les formes optiquement actives, peuvent se résumer comme suit:

¹ Le sel calcaire de l'acide ornithurique racémique cristallise en formes lamellées renfermant 1 molécule d'eau de cristallisation par atome de calcium; les sels calcaires des formes optiquement actives cristallisent en aiguilles et ne renferment pas d'eau de cristallisation.

¹⁾ A l'endroit cité.

2^o Le dérivé monobenzoylé de l'ornithine racémique cristallise en lamelles, tandis que les combinaisons optiquement actives correspondantes cristallisent en aiguilles; le point de fusion de ces dernières est nettement inférieur à celui du composé racémique.

3^o La combinaison d'isocyanate de phényle de l'ornithine racémique cristallise facilement en formes lamellées, tandis que les combinaisons optiquement actives correspondantes ne cristallisent que difficilement et en aiguilles.

En mars 1905.

ERRATUM

Page 138, ligne 1, au lieu de: l'acide α -pyrrolidinecarbonique,
lisez: l'acide oxypyrrolidine- α -carbonique.

TABLE DES MATIÈRES

Sur la méthode de Kjeldahl pour le dosage de l'azote par S. P.	
L. SØRENSEN et C. PEDERSEN	126
1. Créatine	132
2. Créatinine	133
3. Acide urique	134
4. Combinaisons de lysine	134
Études sur la synthèse des acides aminés par S. P. L. SØRENSEN. 137	
V. Acide α -amino- δ -oxyvalérique	137
1. Éther γ -brompropyle-phthalimidomalonique	148
2. Acide α -amino- δ -oxyvalérique	150
3. Transformation de l'acide α -amino- δ -oxyvalérique en acide pyrrolidine- α -carbonique	168
4. Glycocolle allylique	186
La Teneur en azote de la lysine et des composés analogues peut- elle être dosée par la méthode de Kjeldahl? Par S. P. L.	
SØRENSEN et A. C. ANDERSEN	193
Études sur la synthèse des acides aminés par S. P. L. SØRENSEN. 209	
VI. Dédoubllement de l'acide ornithurique racémique en formes optiquement actives	209
1. Ornithurate droit de brucine	210
2. Ornithurate gauche de cinchonine	215
3. Acides ornithuriques droit et gauche	219
4. Ornithurates droit et gauche de chaux	222
5. Ornithines monobenzoyliques droite et gauche	223
6. Combinaisons d'isocyanate de phényle et d'hydantoïne des ornithines droite et gauche	224

FEB 8 1926

Carlsberg Laboratorium
COMPTES-RENDUS

DES TRAVAUX

DU

LABORATOIRE DE CARLSBERG

6^{me} VOLUME, 4^{me} LIVRAISON



COPENHAGUE

EN COMMISSION CHEZ H. HAGERUP

IMPRIMERIE DE THIELE

1906

Prix: 2 Kr. 80 Øre

Toutes les indications thermométriques sont *centigrades*.

kgr.	kilogramme	l.	litre
gr.	gramme	cc.	centimètre cube
cgr.	centigramme	cm.	centimètre
mgr.	milligramme	mm.	millimètre
		μ .	micromillimetre

LES COMPTES-RENDUS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE CARLSBERG

paraissent par livraisons à des époques indéterminées. A mesure qu'il en paraîtra un nombre suffisant pour faire un volume, les abonnés recevront un titre en même temps qu'une table des matières, avec l'indication de la période qu'embrasse le volume.

ON THE PROTEINE SUBSTANCES OF BARLEY, IN THE GRAIN ITSELF AND DURING THE BREWING PROCESSES.

BY
H. SCHJERNING.

A good many years have elapsed since I conceived the idea of setting on foot a series of investigations with the object of studying, from a quantitative point of view, the appearance — formation and transformation — of the so-called proteine substances during the series of processes going on from the formation of the barley corn on the mother-plant till its ultimate transformation into finished and ready stored beer.

It is true that in its broad features this series of transformations are pretty well known, since the doctrine of the change of matter in plants, on the one hand, and, on the other, our actual knowledge of the action of enzymes may help us to form a notion of the direction which the transformation of proteids will take at almost any point of the course of developments and conversions alluded to. But as regards the quantitative aspect of the processes in question, the case is quite different: of these we know next to nothing, at any rate as far as the proteids properly so called are concerned.

From the preliminary experiments inaugurated by me in the year 1892 it became evident, however, that the time for instituting researches of this kind was not yet come, for the simple reason that the analytical methods, current or known at that time, for the separation of the different proteine individuals or groups of proteids had not yet been sufficiently tested — either in point of quantitative accuracy or in regard to the relations between individual precipitations — and, consequently, could not be relied upon in researches of the kind here referred to.

It was this negative result which, in subsequent years, led me to set to work with the task of submitting the quantitative precipitation of proteine substances to a thorough and comprehensive investigation, with a view to subsequently devising, on the basis of the results arrived at, a method enabling me to determine with quantitative exactness. — within reasonable limits, of course — the amounts of the various proteids or groups of proteids co-existing in a solution. The results of these researches, which I published in a series of short memoirs¹⁾, showed that a quantitative analytical determination of the proteine substances is really possible, providing we make constantly use of certain definite precipitants of proteids which not only exhibit constant conditions of precipitation towards the same proteids, even if these are derived from different sources, but also bear the same relation to one another. As for the analytical method itself, I described it in a separate short memoir²⁾.

On the basis of this method I believe it to be possible to estimate the amounts of one or two real albumins³⁾, further of denucleïn, proteoses or albumoses, real peptones, and, as a differential estimation, all non-proteine nitrogenous substances, that is, ammonia and the amine-amid combinations. Thus the way had been prepared for an experimental investigation into the problem, and I felt warranted in hoping to gain an insight into some at least of those many open questions which we meet with in this field of inquiry.

It was at once clear before me that a considerable amount of experimental materials had to be procured before there could be any question of obtaining positive results. For this reason the problem was in the outset planned and divided under the following three sections: —

- I. Formation and transformation of proteine substances during the growth, ripening and storage of barley.
- II. Conversion of proteine substances during malting and storage of malt.

¹⁾ Zeitschr. f. analyt. Ch. **33**, 263 (1894); **34**, 135 (1895); **35**, 285 (1896); **36**, 643 (1897); **37**, 73 (1898); **39**, 545 (1900).

²⁾ *Ibid.* **37**, 413 (1898).

³⁾ In order not to prejudge any part of the question, I have used the designations »Albumin I« and »Albumin II« throughout.

III. Conversion of proteine substances during the series of processes going on in the preparation of wort and its further transformation into ready-stored beer.

In all three sections I have endeavoured to carry out the experiments and make the calculations in such a manner that all the results admit of being re-calculated on a determinate fundamental unity. Further details will be given when we come to describe the modes of working used in each section.

FIRST SECTION.

On the Formation and Transformation of Proteine Substances during the Growth, Ripening and Storage of Barley.

1. Introduction.

The question relating to the occurrence of nitrogenous organic matters in the cereals, and more especially in barley, has for a long time past played a prominent part in both professional and scientific literature, and still, after all, it cannot be claimed that, in any essential particular, it has led to what might be properly called a scientifically established settlement. The reason why it is so is not difficult to find, if I am justified in asserting that the foundation of such a better insight was never yet laid. In order to get at the bottom of the matter, it will be necessary for us to have at our command some analytical methods enabling us to follow, step by step, the transformation, of course quantitatively, of each proteine substance. As, in my opinion, the quantitative method referred to above offers a considerable amount of precision in this respect, it follows that the task does not any longer appear to be a hopeless one.

If we look at the results hitherto gained, it at once becomes conspicuous that, whenever there is a question of the nitrogenous organic substances contained in barley — and more especially in malting barley —, it is almost always the total amount of nitrogen that is referred to, just as if this one factor could settle the whole matter. It is only quite exceptionally

that the view has been advanced that there is also a qualitative or, to put it more exactly, a qualitative-quantitative aspect of the question which requires careful consideration. Still, it is by no means unimaginable that it is in this particular direction that we have to look for the solution of the problem.

We cannot here undertake to give a detailed summary of the — one is tempted to say crowding — literature which deals with the problem as to the nitrogenous matter of malting barley and the allied questions. Such a survey would, as far as I can see, carry us too far into the purely bibliographical field, and, moreover, would not much advance the solution aimed at. It may suffice to point out the leading features of the question.

The investigator by whom the latter was first made the subject of thorough-going consideration was A. Nowacki¹⁾, whose researches deal particularly with the development and physiology of the wheat-grain. They soon, and with perfect justice, attracted the general attention of chemists, and to this day their great significance is undisputable, it being obvious that they really form the foundation of the question relating to the nitrogenous matter of malting barley as well. Nay, the nitrogen problem of malting barley may even plausibly be said to have thus far formed an echo of Nowacki's researches on the wheat-grain.

In Denmark the first to raise the question was the well-known brewer J. C. Jacobsen²⁾, the founder of the Carlsberg Fund, who in a discourse delivered in the year 1870 called the attention to the desirability of clearing up scientifically the cause or causes to which the difference of structure between "mealy" and "vitreous" or "steely" corns of barley is to be traced. This discourse did good service, in that it gave rise to a long series of investigations.

Nowacki³⁾, in regard to the wheat-grain, had asserted that the mealy corn contained a larger quantity of air, imprisoned between the starch granules, than the vitreous corn; and exactly the same result was arrived at by Grønlund⁴⁾ in the case of the barley corn. The first to really clear up the

¹⁾ Untersuchungen über das Reifen des Getreides. Halle 1870.

²⁾ Tidsskrift for Landøkonomi. 1870. p. 269.

³⁾ *loc. cit.*

⁴⁾ Tidsskrift for Landøkonomi. 1880. p. 412.

matter was, however, Samsøe Lund¹⁾, who showed the mealy nature of a barley corn to be conditioned by the presence of a larger quantity of air imbedded between the cell-contents and cell-wall.

With regard to the physical and chemical divergence between soft and hard barley, different views were set forth in the course of a few years. Of these one may be mentioned here, namely the assumption that the mealy barley-corn contains a smaller amount of proteine than the vitreous one.

As regards the question as to whether the mealy corn is *per se* to be preferred over the vitreous one for malting purposes, it is to be noted, that it was proved at an early period, that the vitreous corn, on being steeped in water, will turn mealy. Hence it followed naturally, that the contrast between "mealy" and "steely" could not well be retained as a criterion of the quality of malting barley.

To this day much dissension obtains as to the question whether barleys rich or poor in proteine matter are better suited for malting purposes, just as the above-mentioned relation between the mealy nature of a corn of barley and its amount of proteine matter is still a vexed question. Many, both scientists and industrials, are of a decided opinion that a barley poor in proteine matter possesses a greater value for malting purposes than one rich in this matter, it being also assumed that mealy barleys are less rich in proteids than steely ones; one is even tempted to say that some show a tendency to assign to these two propositions the immutable character of laws of nature. It is noteworthy, however, that not a few *savants* and also industrials take a different, or even diametrically opposed, view. Thus, so far as chemical science is concerned, the matter is in fact still as obscure as it was at the very outset, whereas industrials appear to have made something out of it, chiefly by making a comparison between the demands made in regard to the amount of proteine matter of good malting barleys in the various beer-producing countries. R. Wahl, in a number of pa-

¹⁾ *Ibid.* 1881. p. 442; *vide* also W. Johannsen. *Comptes rendus des Travaux du Laboratoire de Carlsberg* 2, 60 (1884). — In this connection the important researches and publications of G. Holzner deserve also to be mentioned, and more particularly the excellent work "Beiträge zur Kenntniss der Gerste" by Lermer & Holzner. Munich 1888.

pers¹), trenches upon the question as to the relation between the nitrogen content of barley and its value as malting barley. Wahl reports some experiments made by him on an industrial scale in support of his assertions; but I fail to see how his experiments can be conclusive of the question before us. Far more interest attaches to the varied opinions published by several experts and collected in the first article of Wahl. He is undoubtedly justified in drawing from these opinions the conclusion, that, according to experience, we are by no means warranted in asserting that barleys rich in nitrogen are not so fit for malting purposes as those poor in nitrogen. To this, however, the objection may be made, that experience is often based as much upon the evidence of individual sense-perception as upon that of purely experimental observation, so that experience relating to one and the same object may differ in different places, according to local requirements. Suppose for example that malt and beer were prepared in exactly the same manner both in Copenhagen and Chicago from a particular sample of barley. It would then be possible that in one of the two places the product was given the mark "Excellent", whilst in the other place it got only the simple mark "Good", for the plain reason that the demands made in either locality in point of flavour, appearance, keeping powers etc. are not the same. Thus, in this instance, we obtain two somewhat discordant final results; but the discrepancy is not due to the object in itself — the barley — but to the dissimilarity of local requirements.

It is curious to note, however, that in England and America barleys containing a great, or at any rate comparatively great, amount of nitrogen are generally considered to be the best suited for malting purposes, whereas the representatives of the Munich type prefer barleys having a middling nitrogen-content (about 1.64 % N.), the representatives of light-coloured continental beers maintaining, in their turn, that barleys poor in nitrogen are to be regarded as the best raw material.

If we are to state briefly what may be safely considered as established facts with regard to the reciprocal relations between the three factors mealiness, nitrogen-content and quality of malting barley, we may sum up as follows: —

¹) *Americ. Brew. Review* **18**, 89 etc. (1904).

- (1) Hard barley, on being steeped in water, passes more or less completely into soft barley¹⁾.
- (2) Among barley-crops of one and the same plot of land steely corns contain more nitrogen than mealy ones. If, on the other hand, we have to do with barley-crops from different fields, it appears that the relation of mealy or steely nature to nitrogen-content cannot in that way be tied down to rule²⁾. Hence, from the total nitrogen-content of barley it cannot be inferred with certainty whether it is mealy or vitreous; neither will the reverse conclusion hold.
- (3) It has not been proved either scientifically or experimentally that the quality of malting barley depends on its total amount of nitrogen.

It will be seen that this quantitative method of valuing malting barley according to its nitrogen-content is not established on a very solid foundation. It was therefore natural to feel our way one step further, in order to try if the difficulty could not be settled by a combination of a qualitative and a quantitative method.

This is indeed the course taken by A. Kukla³⁾ in a whole series of memoirs, and, subsequently, E. Prior⁴⁾ and Jalowetz⁵⁾ have expressed themselves to much the same effect. —

Kukla is inclined to assume that nitrogenous substances play at least as important a part in the valuation of barley and malt as carbonic hydrates; besides, however, he has a clear understanding that it is not the total amount of nitrogen that is the main point of consideration. He is of opinion that the difference is to be sought in the ratio between certain proteine substances, namely the ratio of coagulable to non-coagulable matter. He defines this ratio more precisely by the enunciation, that the greater the proportion of non-coagulable proteine substances in barley, the less is it fit for malting purposes. Taking

¹⁾ Petri: Aarsber. om det kgl. danske Landhusholdningsselsk. Virks. 1870. p. 53. — C. Grønlund: Tidsskr. for Landøk. 1882, p. 654. — W. Johannsen: Die landwirtschaftl. Versuchsst. 35, 19 (1888). — L. Just & H. Heine: *Ibid.* 36, 269 (1889).

²⁾ C. F. A. Tuxen: Tidsskr. for Landøk. 1881, p. 240. — L. Just & H. Heine: Die landwirtschaftl. Versuchsst. 36, 269 (1889).

³⁾ Zeitschr. f. das gesammte Brauw. 23, 418, 427, 442, 457, 493, 513, 525, (1900).

⁴⁾ Allgem. Zeitschr. f. Bierbrauerei u. Malzfabr. 32, 593 (1904).

⁵⁾ *Ibid.* 32, 567 (1904).

his departure from this entirely novel point of view, Kukla propounds a whole system of valuation of both barley and malt, and even trenches upon the question as to the influence exerted by conditions of soil and climate on the proportion of non-coagulable proteids. Although it seems to me that the work of Kukla is founded on rather an unsafe basis — the estimation of coagulable proteids with quantitative exactness —, still it holds out a new prospect, namely the abandonment of purely quantitative methods for a combination of a quantitative and a qualitative one; to my mind, this means a great step in the right direction.

I believe, indeed, I am fully justified in questioning, as I have done above, the reliability of the quantitative estimation of the coagulable proteids in barley extracts, or even in proteid solutions generally. It is well known that the power of coagulation of a proteine substance and the temperature at which the coagulation occurs depend on other factors than the chemical nature of the particular proteid, such as for instance the proportion of inorganic matter, free acids and free bases contained in the solution¹). In the particular case under discussion, barley extracts, there is another drawback to the matter. The fact is that the aqueous extract indubitably contains two coagulable proteids²), one of which (leucosine) coagulates at 52°, whilst the other (edestine) does not coagulate at temperatures below 90° and only partially at higher temperatures. The inference to be drawn from this circumstance with regard to the basis of Kukla's system seems to me obvious, and the more so as, according to a private communication he has made me, he estimates the proportion of coagulable proteids by adding five or six drops of acetic acid to 100—200 cc. of barley extract and boiling this mixture for thirty minutes. The leucosine is not likely to coagulate, when we consider the results recorded in the above-mentioned publications, and the statements of Osborne render it unquestionable that edestine only coagulates to

¹) For information on the coagulation of albuminoids I may refer to Otto Cohnheim's: *Chemie der Eiweisskörper* 1904, p. 130—134, and to E. Varrenne: *Bull. soc. chim.* **45**, 427 (1886); Van Slyke & B. Hart: *Amer. chem. J.* **33**, 461 (1905).

²) B. Osborne: *Report. Conse. Agricult. Experiment. Station.* 1894, p. 165, V. Griessmayer: *Die Proteide.* 1897, p. 171.

a certain extent. In other words, we cannot attach any value to Kukla's estimation as a basis of a quantitative valuation.

It has hitherto been currently believed that, in judging the quality of malting barley, peculiar importance had to be attached to the chemical composition of the dry substance of barley. In any view of the matter, we shall, to the best of my understanding, sooner or later have to relinquish this view¹⁾. A valuation by the physical and 'physiological properties of the barley will in every case be legitimate and possess a certain general validity, whereas a valuation founded upon the chemical composition of the dry substance is not likely, in my opinion, to be generally received at any time²⁾, for the plain reason that the modes of working used in malting — which are in many respects widely different among themselves — must needs be conclusive of the question as to which sort of barley is best suited to local requirements. If we are to arrive at a clear insight into the significance possessed by the chemical composition of the dry substance of barley with regard to the value of malting barley, it will be necessary to investigate the chemical transformations or modifications which occur in barley during the course of the processes which take place from the formation of the barley-corn in the mother-plant till the ultimate conversion of the barley into ready stored beer. At the same time we must also try to detect the laws to which those transformations are subject.

The present work is an attempt to throw some light on this question, more especially with regard to the transformation of nitrogenous organic substances³⁾. It is a great and wide-ranging problem, which will surely demand a great deal of time and work and give rise to much discussion before a final result

¹⁾ Some recent researches by E. Prior show that the mode actually current in Northern Germany of valuing malting barley is not, at any rate, satisfactory with regard to Austrian barleys. *Allgem. Zeitschr. f. Bierbrauerei u. Malzfabr.* **33**, 412 (1905).

²⁾ For this reason I esteem that the Bavarian system of valuation is more generally applicable than that of the Berlin Station or that proposed by Haase. Comparative inquiries into these three systems were made by C. Bleisch and F. Wagner: *Zeitschr. f. d. ges. Brauw.* **27**, 153 (1904).

³⁾ On carbohydrates see H. Jessen-Hansen: *Compt.-rend. des Travaux du Laborat. de Carlsb.* **4**, 69 (1896).

can be arrived at. But, at all events, I feel confident that the way which will lead up to the goal of our endeavours is the one here indicated.

2. Methods of Working.

The necessary particulars concerning the cultivation of each sample of barley will be briefly given under each experiment. In this place we have only to describe the way in which the samples were taken and each analytical value determined.

The different stages of ripeness were characterized as follows:¹⁾ —

Green-ripeness. Upper leaves green, lower leaves yellow or withered. All the nodes juicy. The corns pale-green, with contents soft as wax and easily detached from the husk. Corns easily crushed. Awns green throughout.

Yellow-ripeness. All the leaves are withered. The lower nodes dry, the upper juicy. Awns greenish yellow, almost without chlorophyll. Corns yellowish with greenish ventral furrow; are not easily crushed.

Full-ripeness. The chlorophyll has entirely vanished, not only from the leaves, but also from the corns and awns.

The samples were taken in the following manner: — On the day when the suitable degree of ripeness had been reached, a convenient number of ears were cut off early in the morning from normally developed plants. The corns were then immediately picked out of the ears and freed from awns and glumes, as also from any impurities and small or broken corns which they might contain, for which purpose the sample, whilst blowing air upon it, was shaken well in a sieve having 32 meshes to each 10 cm. This work was accomplished before noon, so that I had ample time to begin the total analytical work on the very same day. These measures are quite indispensable to obviate transformations in the materials submitted to experiment. Another mode of proceeding, by which such transformations could be prevented, cannot be imagined, as it must be constantly borne in mind that it is the proteine substances with which we are concerned. The possibility of kill-

¹⁾ The mode of characterization here adopted is the same as that used at the Copenhagen Agricultural College.

ing the vital functions of the corns by heating or by chemical reagents — such as for instance alcohol, salts, etc. — had to be precluded at the very outset.

Some of the barley samples had also to be examined with regard to the influence of storage on proteine substances, independently of the general investigation into the question as to ripening. For this purpose the requisite quantity of corns were taken out and subjected to the preliminary treatment and cleansing described above. For the first five to six days the samples were stored on filter-paper in a dry room, where they were exposed to the direct action of day-light; for the rest of the time they were stored in a capacious powder-glass bound over with a layer of filter-paper. During the whole length of the storage time — excepting the first five or six days — the sample was kept in an obscure place at the ordinary temperature of the laboratory, and at least once a week it was shaken well.

Before we go on to the description of the analytical methods used, it is necessary to state, that the unity for which all the experimental results in this section have been calculated is constantly 10,000 corns.

The only fairly constant factor that can be taken for a fundamental unity in experiments concerning the ripening of barley is doubtless one corn. The amounts of dry matter, mineral constituents, nitrogen *etc.*, vary indeed from one stage of development to the next. The only thing which remains constant is the individual corn: one corn is and remains one corn during the whole course of development. If therefore, notwithstanding this, I speak under correction — as I have done above — with regard to this unity also, it is owing to the circumstance that the size of the corns is in itself very variable, even at the same stage of development. Accordingly it is not indifferent either — at any rate as far as the dry matter is concerned — whether the results of the experiments be calculated for 100 of the biggest or 100 of the smallest corns. With a view to eliminating as far as possible the source of error which would necessarily be the consequence of too much heterogeneousness in the size of corns, I have purposely cleansed the materials by means of the sifting process mentioned above. We evidently obtain by this means considerably more uniformity in the size of corns, which in its turn has this further advantage, that the error of

unity will probably be so small as not to affect the results to any material degree. My aim in taking 10,000 corns for a unity is, of course, simply to give the calculated figures a suitable magnitude.

When the results of the analyses are to be re-calculated for a definite corn unity, it will be necessary to get to know with sufficient accuracy the average weight of one or more corns and also the amount of dry matter contained in the corn. We shall then be able to make the requisite re-calculations in a satisfactory manner.

I have used two slightly different methods of working in the experiments.

Method I.

In the first ripening experiment — year 1901 — the analytical determinations were made in the following manner: —

The corn weight is determined by weighing, in a previously tared platinum dish, 100 whole corns counted out indiscriminately. The weight found multiplied by 10 gives the weight of 1000 aqueous corns = a gr.

Dry matter, or more properly water, is estimated by weighing out into a weighing glass with glass stopper 200 whole corns counted out at random, and then drying them for three days in a vacuum — pressure 18 to 20 mm. — at 100° . From the loss of weight is calculated the percentage of dry matter = b %.

Some figures bearing out the trustworthiness of this method are recorded in the following table.

TABLE I.

Dried in a vacuum at 100°	% of water.									
1 day . . .	68.73	62.63	56.26	48.27	12.39	11.48	—	—	—	—
2 days . . .	68.98	63.15	56.70	48.85	12.94	12.06	—	—	11.86	11.70
3 " . . .	69.07	63.35	56.89	49.01	13.26	12.39	12.65	12.60	12.10	11.97
4 " . . .	69.12	63.43	57.00	—	13.38	12.53	12.72	12.66	12.25	12.12
5 " . . .	69.15	63.49	57.06	—	13.52	12.67	—	—	—	—

By calculating from these results the mean values of the differences from day to day we shall get a clearer picture:

Loss of water from 1st to 2nd day	0.49 %
" " " " 2nd " 3rd "	0.23 "
" " " " 3rd " 4th "	0.10 "
" " " " 4th " 5th "	0.09 "

I believe these figures must be interpreted as follows: —

After three days' drying, the water present has evaporated. By further drying, still more water evaporates, it is true, but this loss is not attributable to moisture or, so to speak, mechanically bound water, but, on the contrary, to chemically bound, or hydrate-, water. This assumption is favoured by the circumstance that the loss of water per cent, after the three days' drying, appears to be very nearly proportional to the time of drying. On this account I have thought it convenient not to dry the corns for more than three days.

It is to be observed, however, that, for the sake of preventing gelatinization of the starch — which would of course have greatly protracted and rendered precarious the whole drying process —, the temperature in the vacuum apparatus was not allowed to exceed 50° during the first four to five hours; it was not until the greater part of the water had evaporated that the temperature was raised to 100° .

The total amount of nitrogen was estimated by the method of Kjeldahl, for which purpose 5×20 or 4×25 whole corns, which had been counted out at random, were treated in 5 or 4 flasks respectively. It is found that 100 corns of barley contain a total amount of nitrogen $\approx c.$ cc. $\frac{1}{10}$ normal acid¹⁾.

Ash, or mineral matter, is estimated in 200 whole corns arbitrarily counted out, which are placed in a thoroughly heated porcelain crucible, dried for 20 hours in a common hot air-bath (at from 50 to 105°), and then incinerated at the lowest possible temperature. When the ash has become grayish or grayish white, it is moistened thoroughly with a solution of ammonium nitrate²⁾, dried, and heated to whiteness. Finally, it is made glowing hot for a quarter of an hour in a blowing-lamp. 200 barley corns yield d gr. ash.

Under these circumstances it may be possible that a little alkali passes away during the heating, but phosphoric acid can hardly be lost³⁾; in order to make this error as constant as possible, I have taken due care, in all the estimates, to heat over

¹⁾ Here and in the sequel, the sign \approx means "corresponding to".

²⁾ The ammonium nitrate solution used was prepared by neutralizing concentrated pure nitric acid with concentrated pure ammoniacal water.

³⁾ Since the ash mixed up with water constantly showed a marked alkaline reaction.

the blowing-lamp exactly one quarter of an hour. Add to this that the determination of the mineral constituents was mainly made for the purpose of affording a kind of control of the relations of the individual experiments among themselves, taking it for granted that this quantity increases more or less during the growth of the corn, and finally (at full-ripeness) becomes constant and keeps constant during storage.

It will be necessary to describe in some detail the manner in which the various nitrogenous substances were dissolved and estimated. Of the barley sample cleansed in the above mentioned manner 50 gr. were accurately weighed out, crushed and finely grated, as far as this could be done in a porcelain mortar; in those cases in which the amount of water was so slight as to allow of the corns being finely divided in a mill, they were ground as finely as possible in a mill adapted to the purpose. By means of distilled water the finely divided barley was, with quantitative exactness, transferred into a measuring-cylinder — provided with a glass stopper — of 1000 cc. capacity. This cylinder was filled up with distilled water to 1000 cc., and about 5 cc. of toluene were added for the purpose of preventing a development of bacteria. It was then closed and well shaken. The mixture was left to stand at 18—20° for 20 hours exactly, being now and then well shaken. The proteid solution was filtered off quite clear by means of a dry conic filter of a suitable size. This bright filtrate, which, owing to the slight proportion of toluene contained in it, will keep free from bacteria for several days, is at once made use of for the requisite precipitations of proteine substances and for other estimations. In each of these, 50 cc. of barley extract are used.

The estimation of the various soluble proteids was made by the method elaborated by me¹⁾; it constantly proved necessary to work as if the proteine solution contained no mineral matter²⁾. The various estimates of nitrogen were constantly made by Kjeldahl's method, with the use of the iodometric acid titration, starch³⁾ serving as an indicator.

The quantity of soluble acid is estimated by the method

¹⁾ Zeitschr. f. anal. Ch. **37**, 413 (1898).

²⁾ The conditions in which a proteine solution may be considered to contain no mineral matter, are specified *ibid.* p. 417.

³⁾ Prepared by Syniewski's method. Ber. d. deutsch. chem. Ges. **30**, 2415 (1897).

elaborated by E. Prior¹⁾, *i. e.* by titration with $\frac{1}{10}$ norm. caustic soda.

Suppose that 50 cc. of the above solution contain:

- (1) a total nitrogen amount $\sim a$ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid,
- (2) a nitrogen content in each of the proteine precipitations $\sim \beta$ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid,
- (3) and a total acidity $\sim \gamma$ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. caustic soda.

Before calculating, from the analytical figures thus found, the values for the above-mentioned unity — 10,000 corns —, it is necessary to make a little re-calculation, for the reason that the barley corn has not the same specific gravity as the means of extraction (water); or, in other words, 1 gr. of dry matter does not occupy a volume of 1 cc. In order to make out the relation between the weight and volume of dry matter of barley, with the calculation here aimed at in view, I weighed out into a 100 cc. measuring flask a definite quantity of dry matter of barley, and added from a burette, little by little — in the course of twenty hours —, some distilled water, until the flask was filled just up to the mark. In this way I found that 9 gr. of dry matter of barley required 94 cc. of water to give 100 cc. of mixture at 20°. In other words, 9 gr. of dry matter at 20° occupy 6 cc. This method cannot, it is true, claim a high degree of accuracy, but, at any rate, it is quite satisfactory in the present case.

Taking into consideration the relation here established between the weight and volume of the dry matter of barley, it will be easy to re-calculate the previously determined analytical numbers in such a way as to make them correspond to the unity 10,000 corns:

$$\frac{a \cdot b}{10} = \text{gr. of dry substance in 10,000 corns} = A.$$

$$\frac{14 \cdot c}{100} = \text{gr. of total nitrogen in 10,000 corns.}$$

$$50 \cdot d = \text{gr. of ash in 10,000 corns.}$$

$$\frac{250000 \cdot b}{A \left(1000 \div \frac{b}{3} \right)} = \text{number of barley corns} \sim 50 \text{ cc. of barley extract} = B.$$

$$\frac{14 \cdot a}{B} = \text{gr. of soluble nitrogen in 10,000 corns.}$$

¹⁾ Bayerisch. Brauerjourn. 1, 469; 2, 362; 4, 74.

$$\frac{14 \cdot \beta}{B} = \text{gr. of soluble nitrogen in 10,000 corns,}$$

precipitable by the precipitant concerned. According to the relations¹⁾ between the different precipitations of proteids, the amounts of nitrogen — gr. in 10,000 corns — representing the various proteine individuals or groups can easily be calculated from these figures.

$\frac{1000 \cdot \gamma}{B}$ = the total amount of acid in 10,000 corns, expressed in cc. of norm. NaOH.

Where the germinating power of the barley has been determined, this was always done on 500 grains by the method most generally used²⁾.

Method II.

In the second and third ripening experiments — years 1903 and 1905 —, as also in all subsequent analyses of barley, the analytical methods described in the foregoing pages were modified in two particulars: —

The corn weight was determined by weighing 2×500 whole corns counted out at random, the weight of 1000 aqueous corns (= a gr.) being determined directly, whilst the soluble nitrogenous matter was dissolved by extracting, by the process described on p. 242, the 1000 corns counted and weighed out with water containing toluene; 1000 finely ground barley corns to 1000 cc. of mixture.

As a consequence of these modifications of the mode of working, the number of barley corns corresponding to 50 cc. of barley extract cannot be calculated by the formula given above — see p. 243 —, but must be determined as follows: —

$$\frac{50000}{1000 \div \frac{A}{15}} = \text{number of barley corns} \sim 50 \text{ cc. of barley extract} = B.$$

The rest of the determinations and calculations required in this mode of working were performed entirely in the manner previously described — see pp. 240—43.

It may be appropriate here to make some remarks on the

¹⁾ Zeitschr. f. anal. Ch. 37, 418 (1898).

²⁾ E. Prior: Ch. und Physiol. des Malzes und des Bieres. 1896, p. 60.

above described process by which the soluble proteine substances are extracted from barley.

It must be admitted that at first sight it appears preposterous to assume that the whole of the soluble matter is really dissolved by the mentioned mode of treatment. Nevertheless, provided the materials have been sufficiently ground or crushed, the assumption is sure to hold good, it having constantly to be borne in mind that we are only concerned with the nitrogenous matter and, moreover, only that part of it which is soluble in water, consequently very small quantities of matter. In order to elucidate this point it is necessary to subjoin an account of the experiments having reference thereto. The figures tabulated below, which represent the number of cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid corresponding to the total amount of nitrogen contained in 50 cc. of barley extract, are the results of a series of experiments on the influence of time on the solubility of nitrogenous matter, carried out with various samples of barley and malt.

TABLE II.

Extracted at 18 to 20° in the course of	50 cc. of extract contain nitrogen ∞ cc. $\frac{1}{10}$ norm. acid								
	extracted by means of								
	Water alone	Thymol- water	Toluene water						
			Barley			Malt			
2 hours . . .	—	—	—	—	2·5	2·3	—	6·8	6·5
4 „ . . .	—	—	—	—	2·7	2·6	—	7·2	6·9
20 „ . . .	4·7	6·2	4·1	4·6	3·7	3·6	10·8	8·8	8·4
44 „ . . .	5·2 ¹⁾	8·1 ¹⁾	6·4 ¹⁾	5·0	4·2	4·0	11·4	9·1	8·7
68 „ . . .	6·5 ²⁾	9·0 ²⁾	11·5 ²⁾	5·4	4·5	—	12·0	—	9·1

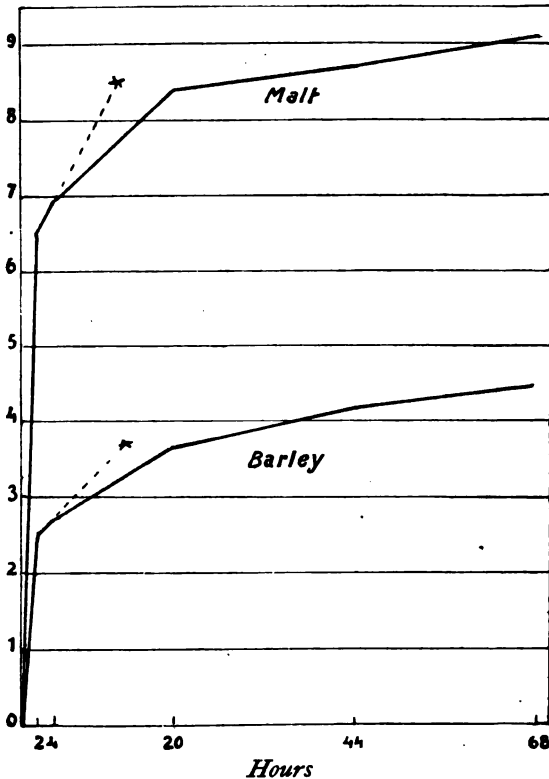
These experiments show, on the one hand, that, of the modes of proceeding here employed, steeping in water containing toluene is the only one which offers sufficient surety in the way of preventing bacteria from developing. But, on the other hand, it will also be seen that twenty hours' treatment with toluene water at 18 to 20° may be considered as satisfactory when the soluble proteids are to be extracted. The circumstance that an increase

¹⁾ The liquid was in a state of incipient putrefaction.

²⁾ The liquid was becoming altogether putrid, showing an increasing growth of bacteria.

of time constantly results in a greater or less augmentation in the amount of the soluble nitrogenous substances, is a necessary consequence of the fact that during the whole course of the operation there occurs a more or less intense enzymatic action. The best way of illustrating the matter will be by plotting out the results of the two completed experiments on a system of coordinates, taking the time as abscissa, and cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid, corresponding to the total amount of nitrogen in 50 cc. of extract, as ordinate.

It clearly appears that, whilst the amount of dissolved nitro-



genous matter is steadily increasing, it is not till when we have reached beyond 20 hours' treatment that a fairly proportional ratio between the time and the increase of nitrogen becomes apparent.

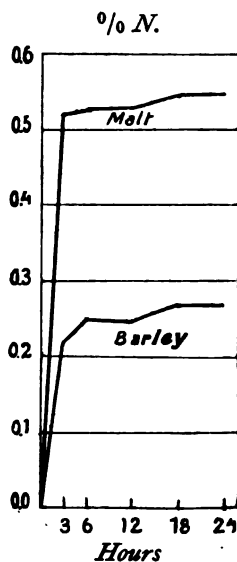
This probably means that only after 20 hours' extraction may we reckon that all has been dissolved that is in itself soluble. The pair of curves here given also seem to justify the conclusion that in the time used the enzymatic ac-

tion itself is minimal; the last part of the curves evidently seems to show that the action can at most correspond to an amount of nitrogenous matter equal to 0.02 cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid per hour. Judging by the dotted secondary curves, the perfect extraction must have been completed after from 13 to 20 hours' treatment¹ (see Table and Note on the next page).

With a view to obtaining a clearer idea of the intensity of the enzymatic action, I prepared a barley extract by the method here described — the toluene water method — and examined the extraction immediately after its preparation and, subsequently, after it had been kept in the dark for seven days at 18°. It was obvious that during this preservation an alteration took place, the extract, which was at the outset altogether bright, becoming turbid. The result of the analysis may be summarized as follows: —

Gr. of nitrogen contained in 10,000 barley corns in the form of	Solution examined	
	at once	after standing for seven days at 18°
Albumin I.....	0·22	0·27
— II.....	0·14	0·07
Denuclein ¹⁾	0·09	0·09
Proteoses or Albumoses.....	0·00	0·02
Peptone.....	0·09	0·02
Ammonia, Amine-Amid.....	0·25	0·32
Soluble Nitrogen. Total.....	0·79	0·79
Acid ∞ cc. of norm. Soda.....	36·9	33·7

If we take into account that slight errors of analysis will always creep in, however carefully we work, it appears that the amount of enzymatic action here indicated must have been quite minimal. The conversion may be more closely defined as follows: — 0·05 gr. of



¹⁾ An altogether similar mode of procedure is described in the "Transact. of the Guinness Research Laborat." Vol. I. Part I. pp. 61—78 (1903). In this memoir a six hours' treatment is found to be satisfactory, with the difference, it is true, that shaking mashines are used, and that the ratio between dry barley and water is not the same. If the experiments recorded in the Transactions — Table III, p. 68 (barley), and Table V, p. 70 (malt) — are brought together in a similar system of coordinates to my own, it will be seen that there is a fair degree of accordance between our results. The way in which the time of treatment is to be interpreted may, however, admit of doubt.

²⁾ Although this denomination is not satisfactory, it is retained in this memoir, because a better one cannot be given as yet. See p. 281.

nitrogen in the form of albumin II has been — perhaps with fixation of acid — either converted into albumin I or, rather, into an insoluble form, which is then of course precipitated out along with albumin I, whilst another 0.02 gr. of nitrogen in the form of albumin II has by a peptic action been converted into proteoses. The denuclein remains altogether unaffected, whilst 0.07 gr. of nitrogen in the form of peptone has been tryptically converted into amine-amid nitrogen. This result is fully in consonance with general physiological observations. Thus Fr. Weis¹⁾ has found that ungerminated barley contains but extremely minute quantities of enzymes, at all events as far as the active ones are concerned. With regard to the intensity of the peptic and the tryptic fermentative power of ungerminated barley our results are somewhat divergent.

Thus an enzymatic action, though by no means a powerful one, does really take place during the extraction; but for the present we cannot well contrive a plan of operation by which this action could be entirely precluded without some at least of the proteids present being at the same time affected in their solubility. —

I have also in another way tried to form an estimate of the applicability of the method.

Let us imagine that one and the same sample of malt is both extracted by means of toluene water in the manner described above and also mashed in the usual manner by the method of proportionality — the prepared mash mixture being just boiled up before the wort is filtered off —; it is then evident that, owing to the enhanced enzymatic action taking place during the mashing process, the mash extract will contain a greater amount of nitrogen than the toluene water extract. Let us further imagine that the toluene water extract contains the whole of the albuminous matter soluble in water (albumins I and II)²⁾ besides, of course, all the cleavage products of albumin; it is then clear that the increase in the nitrogen content of the mash extract must arise from the circumstance that — owing to the enhanced enzyme action — part of the albuminous substances insoluble in water are split up or transformed into soluble matter, which

¹⁾ Compt. rend. des Travaux du Laboratoire de Carlsberg, 5, 285 (1903).

²⁾ This assumption is favoured by the figures given in Table II.

cannot possibly be either albumin I or albumin II, but must be conversion products arising either from the increased peptase action (denuclein, proteoses, peptone) or from the action of the tryptase (ammonia, amine-amid combinations). But at the same time we must assume that the increased enzyme action also performs a work of demolition with regard to some of the albuminous substances directly soluble in water (albumins I and II). The logical consequence must be that the mash extract will contain a less amount of nitrogen in the form of albumins I and II than the toluene water extract, or at any rate never a greater amount. On the other hand, the quantities of all the other nitrogenous substances must of course be greater in the mash extract than in the toluene water extract. If this train of reasoning can be experimentally confirmed, it would appear that we have here an additional support of the accuracy of the toluene water method. The following table gives the results of a series of experiments made with the object of proving this. The experiments were made on different malt samples, some grown out and others half-way up (slightly germinated); the figures indicating how many gr. of nitrogen of each class correspond to 10,000 malt corns.

TABLE III.

No.	Toluene water extract					Mash extract					Differences			
	Albumin I and II	Denuclein, Proteose, Peptone	Ammonia, Amine- Amid.	Sum of soluble N.		Albumin I and II	Denuclein, Proteose, Peptone	Ammonia, Amine- Amid.	Sum of soluble N.		$\alpha + a$	$\beta + b$	$\gamma + c$	$\delta + d$
	a	b	c	d		α	β	γ	δ		\div	$+$	$+$	$+$
1	0.54	0.33	0.90	1.77		0.32	0.48	1.25	2.05		0.22	0.15	0.35	0.28
2	0.46	0.35	0.95	1.76		0.36	0.46	1.28	2.10		0.10	0.11	0.33	0.34
3	0.56	0.30	0.98	1.84		0.39	0.48	1.25	2.12		0.17	0.18	0.27	0.28
4	0.49	0.33	0.88	1.70		0.27	0.53	1.27	2.07		0.22	0.20	0.39	0.37
5	0.57	0.29	1.04	1.90		0.45	0.42	1.25	2.12		0.12	0.13	0.21	0.22
6	0.61	0.23	1.06	1.90		0.46	0.41	1.35	2.22		0.15	0.18	0.29	0.32
7	0.64	0.25	1.11	2.00		0.45	0.40	1.34	2.19		0.19	0.15	0.23	0.19
8	0.57	0.27	0.97	1.81		0.35	0.45	1.37	2.17		0.22	0.18	0.40	0.36
9	0.64	0.26	0.81	1.71		0.53	0.35	1.01	1.89		0.11	0.09	0.20	0.18
10	0.81	0.41	0.79	2.01		0.62	0.48	1.64	2.74		0.19	0.07	0.85	0.73
11	0.82	0.40	1.16	2.38		0.62	0.55	1.41	2.58		0.20	0.15	0.25	0.20
12	0.77	0.39	1.13	2.29		0.55	0.58	1.41	2.54		0.22	0.19	0.28	0.25
Mean											0.18	0.15	0.34	0.31

As will be seen, the difference $\alpha \div a$ is in all twelve experiments a negative quantity, or, in other words, we find that the mash extract always contains a less amount of albumins I and II than the toluene water extract. The table further shows that in all the experiments (excepting No. 10) the differences $\alpha \div a$ and $\beta \div b$ are very nearly identical, though with opposite signs, and also that (again with the exception of No. 10) the differences $\delta \div d$ and $\gamma \div c$ are throughout equal. It seems to me that this tends to show that the higher nitrogen-content of the mash extract is attributable to the circumstance that during the mashing process some of the albuminoids insoluble in water are split up down to the amine-amid-combinations¹⁾ ($\gamma \div c = \delta \div d$), whereas the greater proportions of denuclein, proteoses and peptone of the mash extract originate exclusively in the proteolytic cleavage of the albuminoids soluble in water (albumins I and II) — ($\alpha \div a = \beta \div b$). If this is a legitimate conclusion, it really goes to prove the quantitative accuracy of the toluene water method.

3. Experimental Errors.

After having given in the foregoing pages a complete description of the modes of working used, it will be necessary, before we proceed to deal with the experiments themselves, to make some remarks and observations concerning the analytical errors incident to the experiments.

In researches like these it will be particularly important to form an idea of how great an error of experiment we have to take into account in each determination, since errors will otherwise be apt to creep in when we have to interpret the results. For the purpose of guarding against this, a series of experiments was made — altogether by the above methods — with a definite sample of completely stored barley. It is worthy of notice that the sample had been stored for two years and a half in a linen

¹⁾ This implies a rather powerful tryptase action, which may seem to be at variance with M. Krandaue's observations — see *Zeitschr. f. d. ges. Brauw.*, **28**, 449 (1905) —. I may mention, however, that the malt samples employed in my experiments had all of them been kiln-dried at a temperature not exceeding 45°, a circumstance by which this seeming disagreement between Krandaue's observations and my own may be easily accounted for, the more so if we take also in account the results obtained by Fr. Weis: *Compt. rend. des Travaux du Laborat. de Carlsb.* **5**, 277 (1903).

TABLE IV.

Found for the value		b		a	c	d	B	a	β					γ
Method	No.	The sample contains % of		Weight of 1000 aqueous corns in gr.	N. in 100 corns ∞ cc. of $1/10$ norm. acid	Gr. of ash in 200 corns	Number of corns ∞ 50 cc. of extract	50 cc. of extract contain N. ∞ cc. of $1/10$ norm. acid	as precipitable by					Acid in 50 cc. of extract ∞ 10 norm. NaOH
		Water	Dry substance						as total N.	Sn Cl ₂	Hg Cl ₂	Fe Ac ₂ ÷	Ur Ac ₂ ÷	
I	1	12.23	87.77	43.06	40.1	0.1998	59.8	4.1	1.4	2.5	2.5	2.7	2.1	2.4
	2	12.52	87.48	43.10	42.5	0.1976	59.8	4.4	1.3	2.5	2.5	2.8	2.0	2.3
	3	12.57	87.43	40.79	37.9	0.2050	63.1	4.0	1.4	2.4	2.4	2.7	2.0	2.4
	4	12.72	87.28	41.66	38.1	0.2118	61.8	4.0	1.2	2.5	2.5	2.7	2.0	2.1
	Greatest difference	0.49		2.34	4.6	0.0142	3.3	0.4	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3
II	1	12.23	87.77	43.24	40.1	0.1998	51.3	3.3	1.1	2.1	2.1	2.3	1.7	2.0
	2	12.52	87.48	43.25	42.5	0.1976	51.3	3.5	1.2	2.1	2.1	2.4	1.7	2.1
	3	12.57	87.43	42.98	37.9	0.2050	51.3	3.4	1.1	2.1	2.1	2.3	1.7	2.0
	4	12.72	87.28	43.12	38.1	0.2118	51.3	3.3	1.1	2.1	2.1	2.3	1.7	1.9
	Greatest difference	0.49		0.27	4.6	0.0142	0	0.2	0.1	0	0	0.1	0	0

From these analytical numbers the various values with regard to the unity 10,000 corns are calculated in the manner described on p. p. 243-244. We thus arrive at the numbers stated in the following Table V.

TABLE V.

Method	No.	Gr. of dry substance in 10,000 corns	10,000 corns contain — gr. of nitrogen in the form of										10,000 corns contains		Sum of	
			Albumin		Denuclein	Protease	Peptone	Ammonia, Amine-Amides	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid cc. n. Na OH	Albumin I and II	Denuclein, Protease, Peptone	
			I	II												
I	1	377.9	0.33	0.16	0.10	0	0.04	0.33	0.96	4.65	5.61	9.99	40.1	0.49	0.14	
	2	377.0	0.30	0.17	0.12	0	0.07	0.37	1.03	4.92	5.95	9.88	38.5	0.47	0.19	
	3	356.6	0.31	0.13	0.09	0	0.07	0.29	0.89	4.42	5.31	10.25	38.0	0.44	0.16	
	4	363.6	0.27	0.18	0.12	0	0.04	0.30	0.91	4.42	5.33	10.59	34.0	0.45	0.16	
	Greatest difference	21.3	0.06	0.05	0.03	0	0.03	0.08	0.14	0.50	0.64	0.71	6.1	0.05	0.05	
II	1	379.5	0.30	0.16	0.11	0	0.06	0.27	0.90	4.71	5.61	9.99	39.0	0.46	0.17	
	2	378.4	0.33	0.13	0.11	0	0.08	0.31	0.96	4.99	5.95	9.88	40.9	0.46	0.19	
	3	375.8	0.30	0.16	0.11	0	0.06	0.30	0.93	4.38	5.31	10.25	39.0	0.46	0.17	
	4	376.4	0.30	0.16	0.11	0	0.06	0.27	0.90	4.43	5.33	10.59	37.0	0.46	0.17	
	Greatest difference	3.7	0.03	0.03	0	0	0.02	0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0	0.02	

This table contains the materials requisite for re-calculating the results for the unity 1000 gr. of dry substance. I have made such a re-calculation and brought together the resulting numbers in Table VI.

TABLE VI.

Method	No.	Gr. of dry substance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain — gr. of nitrogen in the form of							1000 gr. of dry substance contain		Sum of			
			Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein, Proteose, Peptone
			I	II											
I	1	377.9	0.87	0.42	0.26	0	0.11	0.88	2.54	12.31	14.85	26.44	106.1	1.29	0.37
	2	377.0	0.80	0.45	0.32	0	0.19	0.97	2.73	13.05	15.78	26.21	102.1	1.25	0.51
	3	356.6	0.87	0.36	0.25	0	0.20	0.82	2.50	12.39	14.89	28.74	106.6	1.23	0.45
	4	363.6	0.74	0.50	0.33	0	0.11	0.82	2.50	12.15	14.65	29.13	93.5	1.24	0.44
	Greatest difference	21.3	0.13	0.14	0.08	0	0.09	0.15	0.23	0.90	1.13	2.92	13.1	0.03	0.14
II	1	379.5	0.79	0.42	0.29	0	0.16	0.71	2.37	12.41	14.78	26.33	102.8	1.21	0.45
	2	378.4	0.87	0.34	0.29	0	0.21	0.83	2.54	13.18	15.72	26.11	108.1	1.21	0.50
	3	375.8	0.80	0.43	0.29	0	0.16	0.79	2.47	11.66	14.13	27.28	103.8	1.23	0.45
	4	376.4	0.80	0.43	0.29	0	0.16	0.71	2.39	11.77	14.16	28.13	98.3	1.23	0.45
	Greatest difference	3.7	0.08	0.09	0	0	0.05	0.12	0.17	1.52	1.59	2.02	9.8	0.02	0.05

bag in a dry locality in the laboratory and, hence, might be regarded as having been brought into a state of absolute equilibrium as regards the composition of the dry substance. The sample was cleaned in the same manner as those set apart for the principal experiments.

With this sample two series of experiments were set on foot, namely one series exactly by method I and another by method II, six to ten days intervening between each experiment.

I attach considerable importance to these determinations of sources of error and, therefore, have thought proper to give all the analytical numbers as directly determined. By means of these, my readers are enabled to judge of the value of these determinations.

The foregoing three tables contain all the details of these experiments. Table IV (p. 251) gives the analytical values as directly determined. The results calculated for the unity 10,000 corns are recorded in Table V (p. 252), and Table VI (p. 253) summarizes the results calculated for the unity 1000 gr. of dry matter of barley.

Method I — see p. 240—244 — is the one employed for the first barley ripening experiment, and Method II — see p. 244 — that used in the second and third principal experiments.

On looking at the “greatest differences” stated in the preceding tables, it will be noticed that they vary somewhat with the different proteids. I therefore believe I am justified in supposing that each proteid estimation is equally subject to error, and it appears to be most natural to take the greatest of the “greatest differences” as the ultimate analytical error in each proteid estimation. This is how I arrive at the ultimate “errors of analysis” collected in the following table, which will be taken into account later, when we come to the interpretation of the experiments.

It is obvious that Method II is more reliable than Method I, for the plain reason that the corn weight is determined by the former with a much higher degree of accuracy than by the latter.

A particular striking feature is the great error which we are obliged to make allowance for in regard to the estimation of total nitrogen, even though, as is done in all these analyses, this estimation is made throughout on 100 corns (about 3 to 4 gr. of dry substance of barley). This, however, is nothing new.

TABLE VII.

Method	Result calculated for the unity	Analytical errors									
		Gr. of dry substance in 10,000 corns	Each of determinations: Album. I, II, Denuclein, Proteose and Peptone	Sum of Ammonia, Amine-Amid	Nitrogen as soluble combinations	Nitrogen as insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc. n. Na OH	Sum of Album. I and II	Denuclein, Proteose and Peptone
I	10,000 corns	21.3	0.06	0.08	0.14	0.50	0.64	0.71	6.1	0.06	0.06
	1000 gr. dry substance	do.	0.14	0.15	0.23	0.90	1.13	2.92	13.1	0.14	0.14
II	10,000 corns	3.7	0.03	0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0.03	0.03
	1000 gr. dry substance	do.	0.09	0.12	0.17	1.52	1.59	2.02	9.8	0.09	0.09

C. Bleisch and P. Regensburger¹⁾ have clearly shown how cautious we must be in regard to our ideas as to the degree of precision with which the total nitrogen content of barley crops can be determined.

This difficulty leads me to put this question: — How can it still be maintained that the total nitrogen content of dry barley may afford a standard in the valuation of malting barley, at any rate within so narrow limits as those proposed by Haase?

4. Principal Experiments.

Barley Ripening Experiment I — (1901).

By the obliging kindness of Professor T. Westermann a lot of ground in the experimental field of the Copenhagen College of Agriculture was left me for use in the cultivation of the barley sample. The lot had a superficial content of about 70 square metres; it was of common manuring cultivation and was subjected to the usual preliminary treatments. In order to have

¹⁾ Zeitschr. f. d. ges. Brauw. 27, 729 (1904).

TABLE VIII.

Date when the sample was taken and examined (1901)	Found for the value	a	b	c	d	A	B	β						γ
								α	50 cc. of extract contain N. ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid as precipitable by					
									as total N.	Sa Cl ₂	Hg Cl ₂	Fe Ac $\frac{+}{-}$	Ur Ac $\frac{+}{-}$	
	Stage of maturity or Time of storage	Weight in gr. of 1000 aqueous corns	The sample contains % of dry substance	N. in 100 corns, 2 cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid.	Gr. of ash in 200 corns	Gr. of dry substance in 10,000 corns	50 cc. of solution 2 number of corns							Acid in 50 cc. of extract 2 cc. of $\frac{1}{10}$ n. Na OH
July 24	Green-ripeness	62.20	35.44	30.4	0.1403	220.4	40.7	5.3	1.0	1.6	1.6	1.7	1.3	1.8
" 30	Late green-ripeness	72.76	46.00	37.6	0.2074	334.7	34.9	4.0	1.4	2.1	2.0	2.2	1.8	1.7
August 5	Yellow-ripeness	75.17	56.81	48.0	0.2504	427.0	33.9	3.4	1.5	2.1	2.2	2.4	2.0	1.2
" 8	Late yellow-ripeness	75.90	58.75	56.0	0.2507	445.9	33.6	3.7	1.8	2.3	2.4	2.6	2.1	1.1
" 13	Full maturity	61.43	72.97	60.0	0.2638	448.2	41.7	4.8	2.3	2.9	2.9	3.2	2.5	2.4
" 19	Over-ripeness	48.22	82.12	53.0	0.2283	396.0	53.3	5.7	2.1	3.5	3.5	4.0	3.1	2.7
September 2	Over-ripeness (14 sample stored 44 for — days 64)	44.25	88.60	55.6	0.2144	392.1	58.2	5.7	1.5	3.6	3.6	4.0	3.1	2.3
October 2		45.35	88.25	52.5	0.2067	400.2	56.8	6.2	1.6	3.7	3.8	4.5	3.3	2.4
" 22		42.63	88.41	58.0	0.2050	376.9	60.4	5.8	1.7	3.4	3.6	4.2	3.2	3.0

A re-calculation of these figures for the unity 10,000 corns gives the following numbers — see Table IX.

(Ripening Experiment I — 1901).

TABLE IX.

Date when the sample was taken and examined (1901)	Stage of maturity or Time of storage	Gr. of dry substance in 10,000 corns	10,000 corns contain — gr. of nitrogen in the form of								10,000 corns contain		Sum of		
			Albumin		Dennuclein	Proteose	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Ni- trogen	Gr. of ash	Acid & cc. n. Na OH	Albumins I and II	Dennuclein, Proteose and Peptone
			I	II											
July 24	Green-ripeness	220.4	0.34	0.11	0.10	0	0.03	1.24	1.82	2.44	4.26	7.0	44.2	0.45	0.13
" 30	Late green-ripeness	334.7	0.56	0.16	0.12	0	0.04	0.72	1.60	3.66	5.26	10.4	48.7	0.72	0.16
August 5	Yellow-ripeness	427.0	0.62	0.17	0.08	0.04	0.08	0.41	1.40	5.32	6.72	12.5	35.4	0.79	0.20
" 8	Late yellow-ripeness	445.9	0.75	0.09	0.12	0.04	0.08	0.46	1.54	6.30	7.84	12.5	32.7	0.84	0.24
" 13	Full maturity	448.2	0.77	0.07	0.13	0	0.10	0.54	1.61	6.79	8.40	13.2	57.6	0.84	0.23
" 19	Over-ripeness	396.0	0.55	0.26	0.11	0	0.13	0.45	1.50	5.92	7.42	11.4	50.7	0.81	0.24
September 2	Over-ripeness { 14 sample stored 44 for — days 64	392.1	0.36	0.39	0.12	0	0.09	0.41	1.37	6.41	7.78	10.7	39.5	0.75	0.21
October 2		400.2	0.39	0.39	0.13	0.03	0.17	0.42	1.53	5.82	7.35	10.3	42.3	0.78	0.33
" . 22		376.9	0.39	0.31	0.09	0.04	0.14	0.37	1.34	6.78	8.12	10.3	49.7	0.70	0.27
Analytical errors		21.3	0.06				0.08		0.14	0.50	0.64	0.71	6.1	0.06	

the various stages of maturation determined in a satisfactory manner, I applied to Mr. A. Christensen, assistant to the Royal Veterinary and Agricultural College at Copenhagen, who was kind enough to charge himself with this part of the task. The experimental plot was, in the early part of May 1901, sown with two-rowed Prentice barley of the Lyngby type. The weather was damp and cold until about the 22nd of June; but from this date till the 23rd of July it was, on the contrary, very warm and dry. During the remaining part of the time that the experiment lasted, the weather was generally dry and warm. On account of these conditions the period of development — reckoned from green-ripeness to full maturity — was of very short duration, *viz.* from the 24th of July to the 13th of August, or twenty days.

The barley thus grown was examined in six different stages of ripeness. The details are given in Table IX. Storage experiments were made only with the last sample — over-ripeness — and extended over 14, 44 and 64 days' storage.

Table VIII (p. 256) contains all the numbers determined by direct analysis. The method used was the one referred to as Method I (see p. p. 240—43).

Barley Ripening Experiment II — (1903).

The cultivation of this sample was made in a lot of the experimental field of the Agricultural College entirely similar to that used for the first ripening experiment. The lot was about the middle of May 1903 likewise sown with two-rowed Prentice barley of the Lyngby type. Towards the end of June the weather was generally cool, with many wet days, followed by a warm and dry period, which lasted till about the 24th of July. From this date till the end of the experiment the weather was rather cool with abundant rain-fall, in consequence of which the period of growth and maturation extended over a greater length of time — *viz.* from the 27th of July till the 28th of August, or thirty-two days — than it did in experiment I.

This experiment, like the preceding one, comprised six different stages of ripeness, about which further details will be given in Table XI. Storage experiments were instituted with the last three maturation samples, which were examined after from 28 to 59 days' storage. In this experiment the analytical determinations were performed according to Method II (see p. 244).

Table X embodies the numbers arrived at in the analyses of the maturation samples, and Table XII those found in the analyses of the storage samples.

TABLE X.

Date when the sample was taken and examined (1903)	Found for the value	a	b	c	d	A	B	α	β							γ	
									50 cc. of extract contain N. ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid								Acid i 50 cc. of extract ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ norm. Na OH
									as total N.	Sn Cl ₂	Hg Cl ₂	FeAc ⁺	UrAc ⁺	MgSO ₄			
July 27	Early green-ripeness	55.94	30.93	23.0	0.1225	173.0	50.6	5.1	1.1	1.5	1.6	1.8	1.1	0.9			
August 3	Late green-ripeness	74.61	36.65	34.4	0.1765	273.5	50.9	6.8	2.4	2.9	3.2	3.4	2.9	1.1			
" 10	Early yellow-ripeness	87.53	43.11	49.2	0.2260	377.3	51.3	8.1	2.8	4.1	4.1	4.4	3.7	1.4			
" 17	Yellow-ripeness	89.56	50.99	59.3	0.2435	456.7	51.6	7.2	3.1	4.4	4.4	4.8	3.9	1.8			
" 28	Full maturity	83.02	59.96	74.0	0.2455	497.8	51.8	7.1	3.1	4.2	4.2	4.7	3.8	1.85			
September 7	Over-ripeness	71.76	67.30	75.5	0.2566	483.0	51.7	6.6	2.0	3.6	3.6	4.2	3.2	2.0			

A re-calculation of these figures for the unity 10,000 corns gives the following numbers — see Table XI.

(Ripening Experiment II — 1903).

TABLE XI.

Date when the sample was taken and examined (1903)	Stage of maturity	10,000 corns contain — gr. of nitrogen in the form of										10,000 corn contains	Sum of		
		Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid 2 cc. n. NaOH	Albumins I og II	Denuclein, Proteose and Peptone	
		I	II												
July 27	Early green-ripeness	1730	0.34	0	0.10	0.02	0.06	0.91	1.41	1.81	3.22	6.13	17.8	0.34	0.18
August 3	Late green-ripeness	2735	0.66	0.06	0.08	0.08	0.06	0.93	1.87	2.95	4.82	8.83	21.6	0.72	0.22
" 10	Early yellow-ripeness	377.3	0.76	0.25	0.11	0	0.08	1.01	2.21	4.68	6.89	11.30	27.3	1.01	0.19
" 17	Yellow-ripeness	456.7	0.84	0.22	0.13	0	0.11	0.65	1.95	6.35	8.30	12.18	34.9	1.06	0.24
" 28	Full maturity	497.8	0.84	0.19	0.11	0	0.13	0.65	1.92	8.44	10.36	12.28	35.7	1.03	0.24
September 7	Over-ripeness	483.0	0.54	0.33	0.11	0	0.16	0.65	1.79	8.78	10.57	12.83	38.7	0.87	0.27
Analytical errors		3.7	0.03					0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0.03	

TABLE XII.

Date when the sample was taken and examined (1903)	Found for the value		a	b	c	d	A	B	α	β					γ	
	Stage of matur- ity	Stored for —days								50 cc. of extract contain N. ∞ cc. of 1/10 norm. acid	as precipitable by					
											as total					
												N.	Sn C's	Hg C's		Fe Ac+ —
August 17	Yellow- ripeness	0	89.56	50.99	59.3	0.2435	456.7	51.6	7.2	3.1	4.4	4.4	4.8	3.9	1.8	
September 14		28	54.45	83.86	60.8	0.2552	456.6	51.6	5.5	1.8	3.7	3.7	4.0	3.2	1.6	
October 12		56	54.03	84.35	60.4	0.2570	455.7	51.6	5.6	1.9	3.7	3.7	4.0	3.3	1.65	
August 28	Full maturity	0	83.02	59.96	74.0	0.2455	497.8	51.8	7.1	3.1	4.2	4.2	4.7	3.8	1.85	
September 25		28	57.30	84.94	76.6	0.2530	486.7	51.7	7.1	3.0	4.4	4.3	4.8	3.8	1.90	
October 26		59	56.87	85.97	80.0	0.2500	490.7	51.7	7.0	2.3	4.4	4.3	4.8	3.9	2.0	
September 7	Over- ripeness	0	71.76	67.30	75.5	0.2566	483.0	51.7	6.6	2.0	3.6	3.6	4.2	3.2	2.0	
October 5		28	58.46	83.47	78.7	0.2613	488.0	51.7	7.2	2.2	4.4	4.5	5.2	4.1	2.1	
November 2		56	57.00	84.71	79.1	0.2610	482.9	51.7	7.6	2.9	4.4	4.4	5.1	4.0	2.15	

A re-calculation of these figures for the unity 10,000 corns gives the following numbers — see Table XIII.

(Storage experiment 1903).

TABLE XIII.

Date when the sample was taken and examined (1903)	Stage of maturity	Stored for — days	Gr. of dry substance in 10,000 corns	10,000 corns contain — gr. of nitrogen in the form of							10,000 corns contain	Sum of		%						
				Albumin		Denuclein	Protease	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations		Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc. n. NaOH	Albumins I og II	Denuclein, Protease and Peptone	Vegetative energy	Vegetative capacity	
I	II																			
August 17	Yellow-ripeness	0	456.7	0.84	0.22	0.13	0	0.11	0.65	1.95	6.35	8.30	12.18	34.9	1.06	0.24	—	—		
September 14		28	456.6	0.49	0.38	0.13	0	0.09	0.40	1.49	7.02	8.51	12.76	31.0	0.87	0.22	5.8	22.2		
October 12		56	455.7	0.52	0.38	0.10	0	0.09	0.43	1.52	6.94	8.46	12.85	32.0	0.90	0.19	63.6	75.8		
August 28	Full maturity	0	497.8	0.84	0.19	0.11	0	0.13	0.65	1.92	8.44	10.36	12.28	35.7	1.03	0.24	—	—		
September 25		28	486.7	0.81	0.22	0.16	0	0.11	0.62	1.92	8.80	10.72	12.65	36.8	1.03	0.27	5.6	12.4		
October 26		59	490.7	0.62	0.44	0.13	0	0.11	0.60	1.90	9.30	11.20	12.50	38.7	1.06	0.24	95.6	99.6		
September 7	Over-ripeness	0	483.0	0.54	0.33	0.11	0	0.16	0.65	1.79	8.78	10.57	12.83	38.7	0.87	0.27	—	—		
October 5		28	488.0	0.60	0.48	0.11	0.03	0.19	0.54	1.95	9.07	11.02	13.07	40.6	1.08	0.33	23.6	38.2		
November 2		56	482.9	0.79	0.29	0.11	0	0.19	0.68	2.06	9.01	11.07	13.05	41.6	1.06	0.32	93.6	99.4		
Analytical errors			3.7	0.03							0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0.03			

Barley Ripening Experiment III — (1905).

The materials for this experiment were cultivated in my garden at Glostrup, near Copenhagen, on a lot of ground 7 square metres in extent. This was a piece of common arable land rich in mould and having a clayey subsoil. The year before it had been taken into cultivation for gardening purposes, and in the autumn it was dug and dunged with horse-manure in the usual manner. In April 1905 the lot was again dug and several times thoroughly raked.

On the 4th of May it was sown with a perfectly pure sample of *Primus* barley from Svalöf — Pedigree improvement —, which had been very kindly sent me by "Sveriges Utsädesförening i Svalöf" (the Swedish Seed-corn Association at Svalöf). The sample, which proceeded from the harvest of 1904 and had been brought under cultivation at the experiment station at Svalöf, had been botanically examined and tested by Dr. H. Tedin, and is entered in the annual report of the above association with No. 0706 in the book of genealogy. Thus there was every safety that the seed sown for this experiment was a perfectly pure stock, and one well defined botanically. In this particular the present experiment differs from the two foregoing, which were made with stocks the purity of which, from a botanical point of view, was less certain.

As regards the weather, it was cold in the month of May; but in June it was warm and dry and very windy, remaining essentially so until the time when the first sample was taken, the 17th of July. From this date till the end of the experiment the weather was warm and of middle humidity. On account of these seasonal conditions the growth and maturation period was of nearly the normal duration, namely from July 17 to August 14, or twenty-eight days.

The experiment comprised four stages of ripeness, for details on which I refer to Table XV. Storage experiments were made with the last three maturity samples, which were examined after from thirty to sixty-three days' storage.

In this experiment the analytical experiments were made by method II (see p. 244).

In Table XIV the analytical numbers for the ripening samples are set forth, and in Table XVI those of the storage samples.

TABLE XIV.

Date when the sample was taken and examined (1905)	Found for the value	Stage of maturity	a	b	c	d	A	B	β							γ		
									50 cc. of extract contain N. ∞ cc. of $\frac{1}{10}$ acid	as total N.	as precipitable by							
											Sn Cl ₂	Hg Cl ₂	Fe Ac ₂ +	Ur Ac ₂ +	Mg SO ₄			
July 17	Early green-ripeness	62.17	30.11	30.9	0.1310	187.2	-50.6	7.5	1.7	2.4	2.5	2.7	1.9	1.0				
August 3	Yellow ripeness	92.20	51.34	79.6	0.2468	473.4	51.6	7.8	3.5	4.7	4.7	5.1	4.2	1.9				
" 14	Full maturity	69.90	66.78	81.8	0.2540	466.8	51.6	5.9	2.2	3.3	3.3	3.6	2.8	2.0				
" 24	Over-ripeness	58.04	70.59	74.3	0.2247	409.7	51.4	6.0	2.2	3.4	3.4	3.8	2.9	2.1				

A re-calculation of these figures for the unity 10,000 corns gives the following results: —

(Ripening Experiment III — 1905).

TABLE XV.

Date when the sample was taken and examined (1905)	Stage of maturity	Gr. of dry substance in 10,000 corns	10,000 corns contain — gr. of nitrogen in the form of										10,000 corns contain		Sum of	
			Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein, Proteose and Peptone	
			I	II												
July 17	Early green-ripeness	187.2	0.47	0.03	0.16	0.03	0.06	1.33	2.08	2.25	4.33	6.55	19.8	0.50	0.25	
August 3	Yellow-ripeness	473.4	0.95	0.19	0.14	0	0.10	0.74	2.12	9.02	11.14	12.34	36.8	1.14	0.24	
" 14	Full maturity	466.8	0.60	0.16	0.14	0	0.08	0.62	1.60	9.85	11.45	12.70	38.8	0.76	0.22	
" 24	Over-ripeness	409.7	0.60	0.19	0.14	0	0.11	0.59	1.63	8.77	10.40	11.24	40.9	0.79	0.25	
Analytical errors		3.7.	0.03					0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0.03		

TABLE XVI.

Date when the sample was examined (1905)	Found for the value		a	b	c	d	A	B	α	β					γ						
	Stage of maturity	Stored for — days								Weight in gr. of 100 aqueous corns	The sample contains % of dry substance	N. in 100 corns cc. of $\frac{1}{10}$ norm. acid	Gr. of ash in 200 corns	Gr. of dry substance in 10,000 corns		50 cc. of solu- tion of corns	as precipitable by				
																	as total	as precipitable by			
																		N.	Sn Cl ₂	Hg Cl ₂	Fe Ac ₃ + Ur Ac ₃ +
August 3	Yellow- ripeness	0	92.20	51.34	79.6	0.2468	473.4	51.6	7.8	3.5	4.7	4.7	5.1	4.2	1.9						
September 4		32	55.90	82.47	77.9	0.2454	461.0	51.6	7.4	2.8	4.3	4.3	5.2	4.2	2.5						
October 2		60	55.45	82.81	79.3	0.2457	459.2	51.6	7.1	2.9	4.0	4.0	4.9	4.0	2.5						
August 14	Full maturity	0	69.90	66.78	81.8	0.2540	466.8	51.6	5.9	2.2	3.3	3.3	3.6	2.8	2.0						
Septemb. 13		30	53.77	86.34	78.4	0.2495	464.3	51.6	6.4	2.3	3.9	3.8	4.4	3.6	2.4						
October 16		63	53.64	86.63	79.3	0.2483	464.7	51.6	6.0	1.9	3.8	3.8	4.1	3.3	2.2						
August 24	Over- ripeness	0	58.04	70.59	74.3	0.2247	409.7	51.4	6.0	2.2	3.4	3.4	3.8	2.9	2.1						
Septemb. 27		34	47.76	84.36	75.8	0.2285	402.9	51.4	6.1	2.0	3.7	3.7	4.1	3.3	2.1						
October 23		60	47.17	86.09	72.7	0.2268	406.1	51.4	6.3	1.9	3.7	3.7	4.2	3.4	2.1						

A re-calculation of these figures for the unity 10,000 corns gives the following numbers — see Table XVII.

(Storage experiment 1905).

TABLE XVII.

Date when the sample was examined (1905)	Stage of maturity	Stored for — days	Gr. of dry substance in 10,000 corns	10,000 corns contain — gr. of nitrogen in the form of								10,000 corns contain	Sum of			
				Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia, Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations		Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc. n. Na OH	Albumins I and II
I	II															
August 3 September 4 October 2	Yellow- ripeness	0 32 60	473.4 461.0 459.2	0.95 0.76 0.79	0.19 0.38 0.30	0.14 0.03 0.00	0 0 0	0.10 0.24 0.24	0.74 0.60 0.60	2.12 2.01 1.93	9.02 8.90 9.17	11.14 10.91 11.10	12.34 12.27 12.29	36.8 48.4 48.4	1.14 1.14 1.09	0.24 0.27 0.24
August 14 Septemb. 13 October 16	Full maturity	0 30 63	466.8 464.3 464.7	0.60 0.62 0.52	0.16 0.36 0.38	0.14 0.08 0.13	0 0 0	0.08 0.13 0.08	0.62 0.55 0.52	1.60 1.74 1.63	9.85 9.24 9.47	11.45 10.98 11.10	12.70 12.48 12.42	38.8 46.5 42.6	0.76 0.98 0.90	0.22 0.21 0.21
August 24 Septemb. 27 October 23	Over- ripeness	0 34 60	409.7 402.9 406.1	0.60 0.54 0.52	0.19 0.36 0.41	0.14 0.11 0.08	0 0 0	0.11 0.11 0.13	0.59 0.54 0.58	1.63 1.66 1.72	8.77 8.95 8.46	10.40 10.61 10.18	11.24 11.43 11.34	40.9 40.9 40.9	0.79 0.90 0.93	0.25 0.22 0.21
Analytical errors			3.7	0.03					0.04	0.06	0.61	0.64	0.71	3.9	0.03	

5. Interpretation of the Barley Ripening Experiments.

Before we proceed to consider the results deducible from the figures embodied in the preceding tables, it must be clear before us that the designations "green-ripeness", "yellow-ripeness", etc., are by no means to be looked upon as absolute values. In fact, the characterization given on p. 238 of the different stages of ripeness must not be regarded as scientifically established, but merely as a purely practical — but also practically legitimate — description. It is no easy matter to gather a conveniently large sample of barley which has arrived at a definite and indisputable degree of maturity. In this respect I feel justified in stating that I have tried to determine with the greatest possible amount of practical accuracy the degree of ripeness at which the samples had arrived, and I dare say my results go to show that my object has been attained. The main point is that we should have before us a progressive series of developmental stages ranging almost from the formation of the barley corn (green-ripeness or early green-ripeness) till it has acquired full maturity: The stage of over-ripeness simply means that the corn has remained in connection with the mother-plant beyond the full ripeness stage. The stage which offers the highest degree of surety as regards a correct judgment is doubtless the stage of full maturity; yet even here slight errors (one or two days) cannot always be precluded, especially when the period of development is very long.

On considering the duration of the developmental periods in the three experiments — reckoning, as before, from green-ripeness or early green-ripeness —, it will be seen that the duration was 20 days in the first, 32 days in the second, and 28 days in the third experiment. We shall therefore be justified in stating that the 1st experiment (1901) had a short, the 2nd (1903) a long, and the 3rd experiment an approximately normal period of development, which was, however, in the last case rather a little too long than too short. In this view of the matter, the duration of the developmental period will be a consequence of the atmospheric conditions obtaining during the particular experiment, provided the date of sowing be as near as possible the same. A short period of development corresponds

to a warm and dry summer, whilst a long period is a result of a wet and cold summer.

Further I must emphasize that the materials employed for the experiments I and II had been grown in one and the same place (the experiment field of the Agricultural College) and proceed from one and the same sort of barley (Prentice barley), whereas the material for experiment III had been grown in a garden at Glostrup and, accordingly, perhaps under somewhat different conditions of soil, besides being developed from Primus barley grown at the experiment station at Svalöf.

Finally, it is also to be observed that I have thought proper to keep development and storage distinct in judging the results, since it will be an easy matter later on to connect these two factors, which are in reality so widely different.

a. Growth and Ripening of Barley.

By way of bringing together in a connected form the numerical results of these experiments, I have plotted them out on two series of curves — see Curve Tables I and II —, where the abscissa lines represent the number of days which have elapsed after the stage of green-ripeness or early green-ripeness, whilst the ordinates represent the values found for the respective combinations or groups of combinations, the unity adopted being 10,000 corns in Table I (excepting the case of dry substance and acidity) and 100 corns in Table II.

For the purpose of forming, to begin with, an idea of the reliability of the continuity in the three maturation experiments, it will be instructive to glance at the four curves "Dry Substance", "Ash", "Total Nitrogen" and "Insoluble Nitrogen" — Table I. It is conspicuous that, within each experiment, these four curves show as close a congruity among themselves as regards their rising and falling off as may reasonably be expected. The apparent deviations in this respect may be said to be so slight that they may be safely referred to analytical errors¹⁾. We shall therefore be justified in considering this accordance as a proof

¹⁾ The magnitude of analytical errors is stated throughout at the bottom of each table.

that the experimental materials are sufficiently reliable to serve as a basis for the following considerations.

In further considering the four curves referred to above — Dry Substance, Mineral Constituents, Total and Insoluble Nitrogens —, it is to be observed at once that the Dry Substance Curve in Table I has been drawn with only $\frac{1}{100}$ of the value for which the other three curves have been put down; hence, of course, Curve Table I can only help us to form a rough estimate. With all four curves, however, it is at once conspicuous that the growth of the barley is particularly strong during that period which extends to the stage of yellow-ripeness. The corn has then very nearly attained its full weight; at any rate, it may be said to have reached its maximum volume. The growth continues, but in a much less degree, from yellow-ripeness to full maturity, at which latter stage the grain has generally attained its greatest dry substance weight; then the growth ceases entirely. If the corn remains attached to the mother-plant beyond the stage of full maturity, a falling off becomes observable not only in the amount of dry substance, but also in that of mineral constituents, total and insoluble nitrogen. Here the objection may be made that mineral constituents, total and insoluble nitrogen in experiment II show a rise from full maturity to over-ripeness, and that dry substance in experiment III is falling off already between yellow-ripeness and full maturity. But when we make due allowance for the value of experimental errors, this objection falls to the ground, and it becomes evident that the above statement holds good. In fact, a reference to Tables XI and XV will show that, in the case of experiment II, the rises occurring from full maturity to over-ripeness are constantly lower than the respective experimental errors, *viz.* for mineral constituents 0.55 and 0.71 respectively, in the case of total nitrogen 0.21 and 0.64, in that of insoluble nitrogen 0.34 and 0.61, whilst the falling off in dry substance from yellow-ripeness to full maturity in experiment III amounts to 6.6 gr., as compared with an experimental error of 3.7 gr.

For the sake of rendering still more apparent the relations between these four curves, I have brought them together in Curve Table II, indicating their mutual relations. In order not to make the table disproportionally large, I have left out that portion of the curves which represents from 0.7 to 3.5 gr. of

substance in 100 corns. The table will be easily intelligible by means of the particulars given in it.

This curve table gives a far more distinct picture of the growth and ripening conditions of barley than Table I, the more so as, besides stating the real values directly found, I have imagined a prolongation of each curve beyond the initial and concluding experiments, these prolongations being of course represented by straight (dotted) lines. This furnishes a picture of the state of things obtaining before and after the experimental periods, although a picture which must be handled very cautiously, especially as regards the after period.

Let us first consider the antecedent periods, as represented by the dotted curve pieces relating to the period preceding the stage of green-ripeness. It will be seen that all four curves meet very near the same point of the abscissa axis; and a further comparison between the three experiments shows that the point of the abscissa line where they converge is (in all three experiments) almost at an equal distance from the green-ripeness stage (point o). This approximate accordance appears to warrant the conclusion that the way in which the barley corn develops, from its coming into existence till the stage of green-ripeness, is not affected to any essential degree by the soil or by changes in the weather, and it also seems to be the same in different varieties of barley. Now since the characteristics of each particular variety were implanted in the very germ of the corn sown, the considerations here given seem to indicate that the variety of barley cannot *per se* be absolutely conclusive for the dry matter composition of the crops. We shall revert to this question later on.

Now if we glance at the after periods — the dotted curve pieces produced beyond the over-ripeness stage —, we at once come across a great difference between the experiments I and II. In experiment I these curves soon fall on the abscissa axis, whereas in experiment II it is only after a very long time that they reach down to it. Now it is evident that our experimental facts do not possibly admit of being interpreted on the assumption that in experiment I the dry substance of the barley corn has been used up altogether when the corn has been allowed to over-ripen on the mother-plant for 93 days, and so forth; certainly such an interpretation will not do at all. On the other

hand, it appears that the following proposition is borne out by facts: Barleys which have had a growth and ripening period of short duration are much more liable to suffer a loss of dry substance by over-ripening than such barleys as have had a long developmental period. It is obvious that variations in the weather have much to do with the question, since the experiments I and II were made with one and the same sort of barley, which had been grown in one and the same plot of land, the only variations being in the atmospheric conditions (1901 and 1903).

Here again we have before us one of those numerous instances of the marvellous way in which nature knows how to adapt everything in the best manner.

The interpretation here suggested is borne out by the facts revealed by experiment III. This experiment was made on Primus barley from Svalöf, which had been grown in a garden at Glostrup under atmospheric conditions approximately normal, yet approaching somewhat nearer to the conditions of experiment II than to those of experiment I. If we compare all three experiments — Curve Table II —, it will be seen that experiment III is intermediate between experiments I and II. It is therefore not likely that the greater or less liability of barley to lose dry substance by over-ripening can be traced to the quality of the particular variety of barley or to the condition of the soil; on the contrary, in the case of all three experiments it is doubtless changes in the atmospheric conditions that are the cause of this difference.

Even from an exclusively quantitative point of view we may perhaps derive some information from Curve Table II. On comparing the dry substance curves of experiments I and II, it appears that the same variety of barley yields a bigger grain in a long than it does in a short period of growth. Experiment III is not conclusive in this connection, since it was made on quite a different variety of barley; nevertheless we see that even in this direction experiment III holds the mean between I and II. Thus, here again it would appear that it is not the variety of barley¹⁾ which is absolutely deci-

¹⁾ In order not to be misunderstood, it is to be observed that *Hordeum distichum* and *H. tetrastichum* (syn. *H. hexastichum*) are throughout regarded as species, *H. d. erectum* and *H. d. nutans* as varieties.

cive¹⁾, but that the weather²⁾, and possibly also conditions of soil etc., exert a far greater influence.

If, from a quantitative point of view, we compare the dry substance curves with the ash curves in all three experiments, it becomes apparent that there is something of an indication that there exists an inversely proportional ratio between them. That is to say, a particularly large-grained barley (having a high dry matter content in each corn) has a lower content of mineral matter (as gr. pr. corn) than a small-grained barley. The divergences are, however, as will easily be seen, so small that I can only advance this as a mere guess. According to G. André³⁾, the strong increase in mineral matter which occurs at the early stages of the growth — this author made his experiments on lupines, Spanish beans and maize — tends to show that these constituents play some part in the conversion of soluble into insoluble carbohydrates. As far as barley is concerned, it appears that this view is not supported by the results of my own experiments⁴⁾. It is true that, also in the case of barley, the percentage of ash in dry matter — see p. 287, Table XXI — is highest at the beginning of the development of the grain; but, to my mind, the interpretation of this fact is to be looked for elsewhere. In all organized beings, whether animal or vegetable, the organic material is built up with an inorganic skeleton for its support. But it is no less certain that the inorganic skeleton must form the groundwork, as it were, of the entire organic structure; or, in other words, the building up of any animals or vegetable organ must be supposed, in the abstract, to begin with an inorganic skeleton, round which organic matter accumulates little by little. This hypothesis makes it easy to understand why the dry matter of the barley corn — and probably any other vegetable organ — is richer in mineral

¹⁾ As to differences of species, on the contrary, it is a well known fact that they give rise to differences in this respect.

²⁾ Manifestly the factor by which the duration of the period of growth is affected more than by any other.

³⁾ Compt. rend. d. l'Acad. des sciences **134**, 995 (1902); **138**, 1510 and 1712 (1904); **139**, 805 (1904); **140**, 1417 (1905).

⁴⁾ If this interpretation were correct, we should certainly expect the ash content during the whole course of development to be directly proportional to the amount of dry matter.

constituents at the commencement of the growth than it is in later stages

It will further be observed that the curves of total nitrogen and insoluble nitrogen go together, or nearly so. Just as André says that the ripening of a seed may be characterized by the progressive transformation of soluble into insoluble carbohydrates, so the conversion of soluble into insoluble proteids might with as good reason be said to characterize the progressive ripening. In both cases, however, it must be borne in mind that the assertions only hold good until the grain has reached the stage of full maturity. In that of over-ripening there is, as we have seen, a marked falling-off in the amount of these substances, as also in that of dry matter, and, consequently, this characterization does not hold good here, it being quite unquestionable that over-maturity is to be regarded as an objectionable form of storage, so that it does not properly come under the category "maturation". The waste of matter which occurs during over-ripening has a striking analogy to an incipient germination, and in so far I believe it quite correct to define the notion of ripening in the way proposed by André, only with this difference that we have at the same time in view the transformation of soluble into insoluble proteine. Thus it may be said that full maturity has been reached when the conversion of soluble into insoluble carbohydrates and soluble into insoluble proteids has ceased or reached its maximum.

In any view of the matter, it must be maintained that the development and ripening properly so called have been completed immediately after the barley grain has reached the stage of full maturity; consequently, any further modification occurring in it cannot be attributable to a continued growth, but is more probably due to an internal transformation of the material stored up in the grain. If the latter remains attached to the mother-plant after having acquired full maturity, there occurs a waste of dry matter, in other words, respiration prevails over assimilation.

It is to be observed here that, just as the over-ripening barley corn suffers a loss both of total nitrogen and dry matter, so the same is true with regard to the wheat-grain¹), although

¹ Nowacki, *loc. cit.*, p. 53. From the last table given here the number of gr.

with the difference that in this latter case the waste of dry matter seems to be of minor importance. Thus it would appear that this peculiarity is of fairly general occurrence.

I will also draw attention to the very close analogy existing between the curve of mineral constituents and that of total nitrogen during the ripening processes of barley. Yet I do not mean to assert that there exists any definite relation of cause and effect between them. But it seems to me rather probable that the cause why the soluble proteines, and, more especially, albumins I and II, are not totally converted into insoluble ones, must be looked for in the very presence of mineral substances; it may, however, be rather the quality than the quantity of these which is decisive.

As regards the numbers of acidity, I may be brief. They simply represent the total acidity of the acid combinations soluble in water, expressed in cc. of normal NaOH for 10,000 barley corns. In Curve Table I this curve is drawn up with only $\frac{1}{30}$ of the value stated above. It will be noticed that, while experiments II and III exhibit full concordance during the development, experiment I is on the contrary very divergent. At first I thought that in experiment I some error might have been made; but I have not been able to find any. To repeat the experiment was impracticable. At all events it seems to be certain that, on the one hand, the amount of the acid combinations soluble in water is on the increase during the whole course of development of the barley corn, and that, on the other, considerable fluctuations may occur, especially during developmental periods of short duration. On the basis of the material under consideration it is impossible to prove the existence of any genetic relation between the acidity curve and one or more of the other curves. It may be that, just as is the case with mineral substances, more thorough investigations into this part of the question are necessary; in the case of acids these investigations should perhaps be of a similar kind to those

of dry matter in 100 wheat-grains can be easily calculated. We arrive at the following numbers:

	Milchreife-a	Gelbreife	Todreife
gr. of dry matter in 100 corns . . .	2.9645	4.2869	4.2325

It is true that these figures indicate but a very little waste of dry matter, but nevertheless they tend to prove the correctness of the above view.

made by E. Charabot and A. Hébert¹⁾ on various vegetable organs.

We now proceed to inquire into the question as to the behaviour of water-soluble nitrogenous substances during the development of the barley corn. It may be natural first to consider the numbers and curves (Curve Table I) expressing the total amount of "soluble nitrogen". In experiment I (short period of development) the curve is falling continually down to the stage of yellow-ripeness; then it rises a very little until full maturity, and at last it shows a slight falling-off during over-maturity. Making proper allowance for analytical errors in this experiment, the amount of soluble nitrogen may, however, be said to remain constant in the individual corn from yellow-ripeness to over-ripeness. On the contrary, a glance at experiment II (long period of development) will show that the curve of soluble nitrogen is continually rising from early green-ripeness to early yellow-ripeness, after which stage it falls till that of over-maturity is reached. In confronting this result with the fact, established in an earlier part of this memoir, that the ripening may be characterized by the progressive transformation of soluble into insoluble proteine, it appears that, in the case of a short development period, the period of growth ranging from "green-ripeness to yellow-ripeness" partakes as much, or even more, of the nature of a maturation than of a real development, whereas the case is entirely the reverse when we have to do with a long period of development.

As regards experiment III (normal period of development), it furnishes further corroboration of the fact established above, that this experiment is in a certain measure intermediate between experiments I and II, though a little nearer to II than to I. If now we bear in mind that, as a matter of course, the plant must take in the nitrogen it requires in the form of soluble combinations, it is evident that the results arrived at go to prove that, when the development of the barley corn (from green-ripeness to yellow-ripeness) takes place during a normal period of development, there exists an absolute equilibrium between the quantity of nitrogen received in a given time and the nitrogen quantity converted in the same time into insoluble combina-

¹⁾ Compt. rend. d. l'Acad. des sciences 138, 1714 (1904).

tions (soluble nitrogen having a rectilinear curve); whereas the transformation of soluble nitrogen combinations into insoluble ones in a short period of development goes on at a quicker rate than does the intake of nitrogen, the reverse being the case in a long developmental period. Thus we have here a very definite evidence of the significance of the weather in regard to the transformation of nitrogenous substances during the growth of the barley corn. If we assume two distinct phases of the development of the barley corn, the above statements may also be expressed as follows: — During a short period of development the ripening process has got the upper hand of the developmental process as early as the stage of green-ripening, whereas in a long period the ripening process does not prevail over the developmental process till a little before yellow-ripeness. During a normal period of development, on the contrary, there is an absolute equilibrium between the developmental and ripening processes from the stage of green-ripeness to that of yellow-ripeness (or, more exactly, to a little before yellow-ripeness).

We have so far only been dealing with the quantitative side within each experiment. It will, however, also be of some interest to consider the quantitative relation between the experiments. Here, however, it is evident that experiment III does not admit of being compared with I and II, since that experiment differs from the two latter both in regard to sort of barley and conditions of soil, factors which are likely to exert a marked influence in the direction here considered. In the following table (see p. 277) I have therefore confined myself to bringing together the quantitative numbers for soluble and total nitrogens as resulting from experiments I and II.

This table shows that the amount of soluble nitrogenous combinations in a barley grain, in any stage following green-ripeness, is larger in a grain which has had a long than in one that has had a short period of development. This fact cannot be simply attributable to the greater intake of nitrogen taking place during the long period of development; this seems to be evident from the annexed differential numbers, the interpretation of which is obvious from the table.

TABLE XVIII.

Stage of maturity	Soluble nitrogen in ripening experiment		Total nitrogen in ripening experiment		Differences	
	I	II	I	II	Soluble N.	Total N.
					II ÷ I	II ÷ I
Early green-ripeness	—	1·41	—	3·22	—	—
Green-ripeness	1·82	—	4·26	—	—	—
Late green-ripeness	1·60	1·87	5·26	4·82	+ 0·27	÷ 0·44
Early yellow-ripeness	—	2·21	—	6·89	—	—
Yellow-ripeness	1·40	1·95	6·72	8·30	+ 0·55	+ 1·58
Late yellow-ripeness	1·54	—	7·84	—	—	—
Full maturity	1·61	1·92	8·40	10·36	+ 0·31	+ 1·96
Over-ripeness	1·50	1·79	7·42	10·57	+ 0·29	+ 3·15
Analytical errors	0·14	0·06	0·64	0·64		

Whilst the difference between total nitrogen in a barley grain of a long and one of a short period of development is steadily increasing till the stage of over-maturity is reached, the difference of soluble nitrogen — taken in the same point of view — increases at first until yellow-ripeness, from which stage it decreases till that of over-maturity is reached. These facts manifestly prove that the weather exerts a sensible influence on the quantitative occurrence and transformations of nitrogenous substances during the ripening process of barley.

We now proceed to a consideration of the six components into which "soluble nitrogen" has been divided by the analytical methods used. More especially, we want to ascertain, first, the way in which the condensation of amine amid combinations into soluble proteids is effected in the course of the development of the barley corn, and, in the second place, the influence which the weather may exert on this process.

A glance at the curves of ammonia, amine, amid nitrogen (A. Curve Table I) will show that they may all three, with good reason, be said to reach their minima at the stage of yellow-ripeness, and thereafter to remain unaltered up to over-maturity. On the other hand, that part of the curves which represents the period prior to yellow-ripeness is seen to exhibit marked differences in the three experiments. Certain it is, however, that at some point or other of the course of development the amount

of amine amide, as well as also all the other amounts of substances expressed by curves, must have been = 0; in other words, all the curves must have their starting-points somewhere in the abscissa line. Hence it manifestly follows that — in all three experiments — the amine amid curves have reached their maxima before yellow-ripeness, but that the distance between maximum and yellow-ripeness is variable. On comparing only the experiments I and II with each other, we arrive at this further conclusion that this maximum is in the vicinity of the stage of yellow-ripeness when the barley grain has a long period of development, and that, according as the period shortens, the maximum becomes more and more distant from that stage of development. As to experiment III, it cannot be ascertained whether it admits of being interpreted in the same manner, because we lack determinations relating to the phases lying between early green-ripeness and yellow-ripeness, that is, that part of the development within which the maximum for this experiment must be sought. However, the general aspect of the curve relating to experiment III tends to show that the above statements apply to this experiment also.

The upshot of these considerations is manifestly that the condensation of the amine amid combinations into soluble proteids takes place with greater intensity during a short than during a long period of development, and that this process is very nearly in an equilibrium with the further intake of nitrogen as soon as yellow-ripeness is reached.

The existence of such an equilibrium may not be quite evident from the curves, the only immediate conclusion deducible from these being that, in any period of development the amount of amid nitrogen in a barley grain remains constant from yellow-ripeness to over-maturity. However, the matter will be readily cleared up if the amount of amid nitrogen is re-calculated in such a manner as to express the percentage of total nitrogen. I have made such a re-calculation, the results of which are set forth in the following table (see p. 279).

The analytical error incidental to this mode of calculating the results can be easily found by means of the numbers stated in Table V, Method II, p. 252. A simple calculation will show that the error corresponds to 0.8.

TABLE XIX.

Stage of maturity	Percentage of total nitrogen in the form of ammonia, amine, amid nitrogen. In ripening experiment		
	I	II	III
Early green-ripeness	—	28.3	30.7
Green-ripeness	29.1	—	—
Late green-ripeness	13.7	19.3	—
Early yellow-ripeness	—	14.7	—
Yellow-ripeness	6.1	7.8	6.6
Late yellow-ripeness	5.9	—	—
Full maturity	6.4	6.3	5.4
Over-ripeness	6.1	6.2	5.7

If we take this error into account, it will appear from the numbers given in Table XIX that the equilibrium mentioned above does occur at the stage of yellow-ripeness.

As regards the quantitative relation between the three experiments, I do not believe any positive result can be deduced from them. It is true that a slight difference is observable — nearly in the same direction as mentioned in regard to “soluble nitrogen” —, but the divergences are so insignificant as not to warrant any safe conclusion.

An inspection of the curves representing Albumin I (I, Curve Table I) will show at once, in the case of all three experiments, that the amount of this proteid is increasing until about the stage of yellow-ripeness, after which it decreases up to over-maturity. The rate at which this decrease takes place is somewhat different in each experiment; but the difference is comparatively so slight that it may be accounted for by analytical errors.

With regard to the curves for Albumin II (II, Curve Table I), all three experiments give perfectly analogous results. The amount of albumin II in a barley corn increases — in a greater or less degree — till about yellow-ripeness; then it decreases a little or, rather, remains unaltered from yellow-ripeness till full maturity, and, finally, it increases again — in a greater or less degree — from full maturity to over-maturity. — No climatic influence can be shown to assert itself in the case of either of these two proteids.

Before leaving the discussion of these two curves, I would draw attention to the fact that when the barley corn has arrived at its full development (yellow-ripeness), the subsequent portions of the curves (albumins I and II) apparently exhibit an inverse ratio to each other, or, in other words: When albumin I decreases, albumin II increases, and *vice-versa*. This, however, must by no means be interpreted as a proof that albumin I can be converted into albumin II, because the fact referred to may just as well be due to quite different transformations. That such do take place, is apparent from the sum of the albumins I and II (Tables IX, XI and XV), which would necessarily be a constant quantity if we had to do with a pure and simple conversion of albumin I into albumin II. The experiments here described do not enable us to get at the bottom of this question.

It still remains to examine the results relating to the three proteine individuals denucleïn, proteose and peptone. The numeric quantities concerned are not given in Curve Table I, because the deviations occurring from one developmental stage to the next are so slight as to fall in most cases within the limits of analytical errors.

As regards the appearance of proteoses in the three experiments (Tables IX, XI and XV), the tables show that these generally do not exist in the barley grain at all, either during its growth or ripening; at most, we find mere traces of them. It seems to me that this fact lends some countenance to the assumption that the condensation of amine amid combinations into proteine individuals of a higher order does not take place with the proteoses as intermediate terms, but that the proteoses are exclusively to be regarded as hydrolytic cleavage products of already existing proteine individuals of a higher order. Here, indeed, we meet with the most striking contrast between construction and demolition (or formation and transformation) of nitrogenous substances of a proteine character. In this connection it is also to be observed that we may no doubt come across barley crops containing a more or less considerable amount of proteoses, but, on closer inspection, it becomes apparent that this is only the case when the barley after reaping has been exposed to the action of a somewhat unpropitious weather, or, in other words, when the barley has begun to germinate before

the harvest. Accordingly, a noticeable amount of proteose in a barley crop must always be considered as indicative of rather unfavorable harvest conditions.

In regard to the appearance of real peptones during the development of the barley grain, all three experiments go to show that this proteid increases in quantity both during the growth and during the ripening of the grain. The peptones themselves occur only in very small quantities in the barley grain, the increase taking place from one developmental stage to the next being also insignificant; still, for all that, an increase does evidently take place. It seems to me that this latter fact gives some countenance to the hypothesis that in the condensation of amine amid combinations into proteine individuals of a higher order the real peptones act as intermediate terms. This hypothesis is supported by the circumstance that the process on which the condensation of the amine-amid-combinations depends cannot possibly be of an unvarying intensity during the whole course of development of the barley grain, but must necessarily decrease as the grain acquires a greater and greater density or maturity.

The amount of denucleïn remains unaltered during the whole course of the growth and ripening process of the barley corn, from green-ripeness to over-maturity. Hence, the figures do not throw any light at all on the question as to whether or not denucleïn is an intermediate term in the formation of albumins. With regard to the appearance of this group of organic nitrogenous substances in the barley grain, we shall not be able to gain an insight into it until the chemical nature of this particular substance has been better cleared up. It may be observed here that denucleïn is precipitated by mercuric chloride from a neutral liquid, as also by ferric acetate and uranium acetate, whereas it cannot be salted out by magnesium sulphate from an acid liquid. Thus, denucleïn cannot be assumed to be a real albumin or a proteose; neither, being precipitable by ferric acetate, can it be considered as a real peptone. The name denucleïn was given by me to this substance on the assumption that it was some cleavage product of a nucleo-albumin. I have set on foot investigations which, I hope, will enable me later on to throw some light on this peculiar nitrogenous substance.

b. Storage of Barley.

As regards the changes which go on in the barley corn during storage, an inspection of the last four series of numbers in Table IX and all the series in Tables XIII and XVII will show that the numbers exhibit so small fluctuations within each group of substances that their interpretation would not be facilitated by plotting them out on a system of coordinates. The fluctuations or changes indicated by the above three tables deviate, in general, only very little from the analytical error found.

If we are to gain a clear insight into the way and direction in which the quantity of each group of substances alter during

TABLE XX.

Survey of the Transformations going on during Storage (two months).

Group of substances	Exper. I (1901)	Experiment II (1903)			Experiment III (1905)		
	Over- ripeness	Yellow- ripe- ness	Full- ripe- ness	Over- ripe- ness	Yellow- ripe- ness	Full- ripe- ness	Over- ripe- ness
Gr. of dry substance in 10,000 corns.	o	o	? (+)	? (o)	+	o	? (o)
Albumin I.	+	+	+	+	+	+	+
Albumin II.	+	+	+	? (+)	+	+	+
Denuclein	o	o	o (+)	o	+	? (o)	o (+)
Proteose	o	o	o	o	o	o	o
Peptone	? (o)	o	o	o	+	? (o)	o
Ammonia, Amine, Amid. .	o (+)	+	o (+)	? (o)	+	+	o
Soluble nitrogenous combi- nations	? (+)	+	o	+	+	? (o)	+
Insoluble nitrogenous com- binations	? (+)	o (+)	o (+)	o	o	o	o
Total Nitrogen	? (+)	o	o	o	o	o	o
Mineral constituents	o (+)	o	o	o	o	o	o
Acid	?	o	o	o	+	+	o

Explanation of the signs: —

- o = No change, allowance being made for the analytical error.
 + = Absolute decrease, " "
 + = Absolute increase, " "
 ? = Numbers fluctuating.
 o (+) = Doubtful decrease, " "
 o (+) = Doubtful increase, " "
 ? (+) = Numbers fluctuating, though rather decreasing.
 ? (+) = Numbers fluctuating, " " increasing.
 ? (o) = Numbers fluctuating, " " constant.

} In all these cases the divergences are so small as hardly to be of any consequence.

the storage of barley, this can best be realized, I believe, by an examination of Table XX. In this table I have tried, by means of simple signs, to give a general view of the changes which are going on in each group of substances during storage, the duration of which extends to two months. The material is arranged with regard to the stage of maturity within each experiment. The meaning of the signs used is explained below. If my readers wish to follow the changes quantitatively, this can most easily be done by constantly referring to Tables IX, XIII and XVII.

The barley grain cannot, as a rule, be said to suffer a loss of dry matter during storage. An exception is formed by the yellow-ripeness sample of experiment III, which indicates a waste of dry matter — during a two months' storage — corresponding to 14.2 gr., as against an analytical error of 3.7 gr. In all the other cases the departures are so small as to be of no consequence. Hence, a respiration loss is not likely to occur during the storage of barley, provided the latter takes place under suitable conditions — not in damp air, and with no access of light —, and providing also the barley sample has reached a suitable degree of maturity before being reaped.

In considering the results arrived at with regard to mineral constituents, total nitrogen and insoluble nitrogen, we meet with some slight divergences, it is true, but these are so minimal that they do not signify. Exactly the same is true with regard to the proteid groups denuclein, proteose and pepton, the yellow-ripeness sample of experiment III being excepted. In this sample the denuclein entirely disappears during the storage, whilst the amount of peptone is increasing in proportion. It does not appear whether this peculiar and, as it would seem, rather exceptional fact is conditioned by the particular sort of barley, or perhaps attributable to the circumstance that the yellow-ripeness sample in experiment III may have been reaped a little earlier than in experiment II. The most remarkable feature in the case is, however, that we are here in presence of an instance in which we have cogent reasons for assuming, that denuclein is converted, even quantitatively, into peptone.

On consideration of the substance groups ammonia,

amine-amid, and soluble nitrogen, it will be noticed that these behave identically in the main. In the yellow-ripeness samples both of them decrease during storage; in the full maturity samples they remain constant or still exhibit a slight tendency to decrease a little, whereas in the over-maturity samples they remain unaltered or show a disposition to increase a little. Thus, at this stage a reaction, though only a slight one, becomes apparent, which must of necessity be attributable to the difference of ripeness. I would here refer to the statement made on p. 273 with regard to the definition of "over-ripening" or "over-modification". The definition given there seems to me to be corroborated in a measure by the results arrived at here, since these evidently show that in the stage of yellow-ripeness the equilibrium in regard to the progressive transformation of the nitrogenous substances in the barley grain does not yet occur, whilst in the full maturity stage the equilibrium is apparent; on the contrary, when the stage of over-maturity is reached, the equilibrium is again broken off, or rather broken down (in the opposite direction).

On examining the albumins I and II, it at once becomes conspicuous that, in any stage of ripeness, these two proteids form a contrast to each other during storage¹). As far as can be seen, albumin I decreases during storage, whereas albumin II increases. Only in the case of the over-maturity sample of experiment II — long period of development — we meet with the exact reverse.

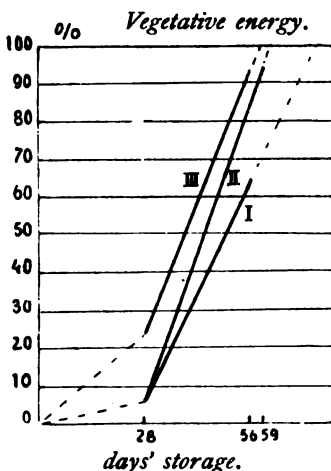
As regards the numbers of acidity, no definite conclusion can be drawn from the results, any more than in the case of the development samples.

The conclusion at which we have arrived seem to show that the ripening barley grain is tending toward a state of equilibrium in regard to its nitrogenous constituents, and that when, on the harvesting or, more exactly, the reaping of the barley, this equilibrium has been attained, it is not disturbed or broken off during storage, except in the case of albumins I and II.

The figures embodied in Table XIII and expressing the

¹) This fact decidedly points in the same direction, and is in full concordance with the result I arrived at in regard to their mutual relation — see p. 280.

vegetative energy and capacity, tend to show that in my full-maturity samples we have to do with normally and full grown barley corns; but, at the same time, it becomes manifest that the germinative power is not affected by an over-ripening, except in so far as in the over-maturity sample the maximum may be reached after a storage of shorter duration than in the full maturity sample. On the other hand, the yellow-ripeness sample requires a considerable longer storage to attain its full power of germination. This is best illustrated by the accompanying curve-table, in which I means the yellow-ripeness sample, II the full maturity and III the over-maturity sample. All three curves have been produced both up- and downwards — with dotted lines — in order to furnish a clearer picture. Any further explanation will be superfluous.



6. The Barley Ripening and Storage Experiments viewed from a practical standpoint.

In considering the above described changes going on in a barley corn during its growth, ripening and storage, it is to be observed that they are not particularly fit for giving a picture of the quality of the barley crops. In order to obtain this from the experiments made, it will be necessary to re-calculate our results with barley dry matter as a unity. We shall thus get a collection of numbers which industrials may find directly applicable and perhaps be able to turn to account. The Tables IX, XI, XIII, XV and XVII, contain all the data requisite for such a re-calculation. In Tables XXI and XXIII the whole of the experimental material is set forth, calculated with regard to the unity 1000 gr. of dry matter.

It is a matter of course that this mode of calculating the results must give a somewhat different picture and to a certain extent exhibit another displacement in respect to the quantity of each particular group of substances from one stage of develop-

ment to the next. Some of the interpretations advanced above will, of course, be confirmed by the new figures; but these will more particularly throw considerable light on the relation of each group of substances to barley dry matter.

Table XXI sets forth the experimental results obtained in regard to the development and maturation of barley, as calculated as — gr. of substance in 1000 gr. of dry matter.

On examining in this table the numbers relating to each ripening experiment, it will be noticed that those representing mineral constituents, acid, total nitrogen, soluble and insoluble nitrogen, and ammonia-amine-amid nitrogen, exhibit considerable fluctuations from one developmental stage to the next, although not to the same extent in all the experiments (owing perhaps to the influence of the weather). Hence it appears that in the case of these groups of substances there does not exist any constant relation with regard to dry matter.

In the case of the proteids properly so called we also, it is true, fall in with some fluctuations from stage to stage, but these are generally so small as to be all but covered by the corresponding analytical errors. Certain it is, nevertheless, that the quantities of albumins I and II and denuclein do not show constant values in the dry matter during the development.

On a closer inspection of the numbers given in Table XXI, it will be found, however, that the greatest fluctuations within each group of substances occur in the early stages, those prior to yellow-ripeness. On the contrary, from yellow-ripeness to over-maturity, that is, during the maturation properly so called, we generally meet only small fluctuations. In order to render this more apparent, I have brought together in Table XXII all the numbers relating to the yellow-ripeness and over-maturity samples, with the addition of the differences between these two series of numbers.

These differential numbers are illustrative of the modification which the chemical composition of dry matter is apt to undergo when barley is harvested at different stages lying between yellow-ripeness and over-maturity. The direction taken by the modification appears from the table and is indicated by the signs. We find that the amount of albumin I decreases in a greater or less degree as the corn is allowed to

(Barley ripening Experiment).

TABLE XXI.

Ripening Experiment No. and Year	Date when the sample was taken and examined	Stage of maturity	Gr. of dry substance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain — gr. of nitrogen in the form of								1000 gr. of dry subst. contain		Sum of Albumins I and II	Denuclein, Proteose and Peptone	
				Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia	Soluble combining	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash			Acid & cc. n. Na OH
				I	II											
I (1901)	July 24	Green-ripeness	220.4	1.54	0.50	0.45	0	0.14	5.62	8.25	11.08	19.33	31.8	200.5	2.04	0.59
	" 30	Late green-ripeness	334.7	1.67	0.48	0.36	0	0.12	2.15	4.78	10.94	15.72	31.7	145.5	2.15	0.48
	August 5	Yellow-ripeness	427.0	1.45	0.40	0.19	0.09	0.19	0.96	3.28	12.46	15.74	29.2	82.9	1.85	0.47
	" 8	Late yellow-ripeness	445.9	1.68	0.20	0.27	0.09	0.18	1.03	3.45	14.13	17.58	28.0	73.3	1.88	0.54
	" 13	Full maturity	448.2	1.72	0.16	0.29	0	0.22	1.20	3.59	15.15	18.74	29.5	128.5	1.88	0.51
	" 19	Over-ripeness	396.0	1.39	0.66	0.28	0	0.33	1.13	3.79	14.95	18.74	28.8	128.0	2.05	0.61
II (1903)	July 27	Early green-ripeness	173.0	1.97	0	0.58	0.12	0.35	5.13	8.15	10.46	18.61	35.4	102.9	1.97	1.05
	August 3	Late green-ripeness	273.5	2.41	0.22	0.29	0.29	0.22	3.41	6.84	10.78	17.62	32.3	79.0	2.63	0.80
	" 10	Early yellow-ripeness	377.3	2.01	0.66	0.29	0	0.21	2.69	5.86	12.40	18.26	29.9	72.4	2.67	0.50
	" 17	Yellow-ripeness	456.7	1.84	0.48	0.28	0	0.24	1.43	4.27	13.90	18.17	26.7	76.4	2.32	0.52
	" 28	Full maturity	497.8	1.69	0.38	0.22	0	0.26	1.31	3.86	16.95	20.81	24.7	71.7	2.07	0.48
	Septemb. 7	Over-ripeness	483.0	1.12	0.68	0.23	0	0.33	1.35	3.71	18.17	21.88	26.6	80.1	1.80	0.56
III (1905)	July 17	Early green-ripeness	187.2	2.51	0.16	0.85	0.16	0.32	7.11	11.11	12.02	23.13	35.0	105.8	2.67	1.33
	August 3	Yellow-ripeness	473.4	2.01	0.40	0.30	0	0.21	1.56	4.48	19.05	23.53	26.1	77.7	2.41	0.51
	" 14	Full maturity	466.8	1.29	0.34	0.30	0	0.17	1.33	3.43	21.10	24.53	27.2	83.1	1.63	0.47
	" 24	Over-ripeness	409.7	1.46	0.46	0.34	0	0.27	1.45	3.98	21.40	25.38	27.4	99.8	1.92	0.61
Analytical errors in experim. } } II and III			21.3	0.14				0.15	0.23	0.90	1.13	2.92	13.1	0.14		
			3.7	0.09				0.12	0.17	1.52	1.59	2.02	9.8	0.09		

TABLE XXII.

Ripening experi- ment No. and Year	Stage of maturity	Gr. of dry substance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain — gr. of nitrogen in the form of								1000 g. of dry sub- stance contain		
			Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc n. Na OH
			I	II									
I (1901)	Yellow-ripeness	427.0	1.45	0.40	0.19	0.09	0.19	0.96	3.28	12.46	15.74	29.2	82.9
	Over-ripeness	396.0	1.39	0.66	0.28	0	0.33	1.13	3.79	14.95	18.74	28.8	128.0
	<i>Difference</i>	+ 31.0	+ 0.06	+ 0.26	+ 0.09	+ 0.09	+ 0.14	+ 0.17	+ 0.51	+ 2.49	+ 3.00	+ 0.4	+ 45.1
II (1903)	Yellow-ripeness	456.7	1.84	0.48	0.28	0	0.24	1.43	4.27	13.90	18.17	26.7	76.4
	Over-ripeness	483.0	1.12	0.68	0.23	0	0.33	1.35	3.71	18.17	21.88	26.6	80.1
	<i>Difference</i>	+ 26.3	+ 0.72	+ 0.20	+ 0.05	0	+ 0.09	+ 0.08	+ 0.56	+ 4.27	+ 3.71	+ 0.1	+ 3.7
III (1905)	Yellow-ripeness	473.4	2.01	0.40	0.30	0	0.21	1.56	4.48	19.05	23.53	26.1	77.7
	Over-ripeness	409.7	1.46	0.46	0.34	0	0.27	1.45	3.98	21.40	25.38	27.4	99.8
	<i>Difference</i>	+ 69.7	+ 0.55	+ 0.06	+ 0.04	0	+ 0.06	+ 0.11	+ 0.50	+ 2.35	+ 1.85	+ 1.3	+ 22.1
Analytical errors { I in experiment II and III			21.3 3.7	0.14 0.09				0.15 0.12	0.23 0.17	0.90 1.52	1.13 1.59	2.92 2.02	13.1 9.8

attain a greater and greater degree of maturity, whereas the quantities of albumin II, insoluble nitrogen, total nitrogen¹⁾ and the water-soluble acid combinations increase in a greater or less degree. The amount of water-soluble nitrogenous combinations is also subject to considerable fluctuations, which, however, are sometimes positive, sometimes negative, probably owing to the influence of the weather. In the case of denucleïn, proteose, peptone, ammonia, amine-amid and ash, the fluctuations are so small that they must without doubt be considered as analytical errors. Consequently, as far as these latter groups of substances are concerned, the results manifestly prove that, in each individual barley sample, they have a constant weight in the dry matter, as soon as the corn has reached its full development, so that they remain constant during the real ripening process.

All three experiments show that, when the barley crop is reaped at an early stage of its growth — between yellow-ripeness and full maturity —, it will be less rich in nitrogen than will be the case when it is reaped later, between full maturity and over-maturity. Thus, with regard to barley my experiments have given a result which is in perfect accord with those obtained by Nowacki²⁾ in the case of wheat.

Now if we ask, what changes take place with regard to the composition of dry matter during the storage of barley, it is necessary to look at Table XXIII. On looking over the numbers contained in this self-explanatory table, we find that, as a general rule, the changes undergone by the dry matter during storage depart but very little from the analytical errors found.

The following table (XXIV) gives a summary view of the informations which can be derived from the numbers referred to. The changes taking place during storage are expressed by signs, in exactly the same manner as in Table XX, p. 282.

On comparing this table (see p. 291) with Table XX, p. 282, it will at once be noticed that there is a perfect concordance

¹⁾ W. Johansen: Compt. rend. des Travaux du Laborat. de Carlsberg 4, 122 (1899).

²⁾ *loc. cit.*

II (100%)	Yellow, ripened	Analysis of (100%)										Analysis of (100%) Total in equm	Total III	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
28	450.6	1.74	1.07	0.85	0.25	0	0.25	1.31	3.80	10.05	20.1	27.6	10.1	27.6
50	455.7	1.14	0.83	0.22	0	0.20	0.05	1.27	3.94	18.00	22.03	20.0	10.1	20.0
0	407.8	1.00	0.38	0.22	0	0.20	0	1.31	3.80	10.05	20.1	27.6	10.1	27.6
28	480.7	1.00	0.45	0.33	0	0.23	0	1.27	3.94	18.00	22.03	20.0	10.1	20.0
50	490.7	1.20	0.90	0.20	0	0.22	0	1.23	3.87	18.05	22.82	25.5	10.1	25.5
0	484.0	1.12	0.08	0.23	0	0.33	0	1.35	3.71	18.17	21.88	20.0	10.1	20.0
28	408.0	1.21	0.98	0.43	0.00	0.30	0	1.31	4.00	18.58	22.53	20.8	10.1	20.8
50	484.0	1.04	0.60	0.21	0	0.30	0	1.41	4.27	18.05	22.92	27.0	10.1	27.0
0	471.4	2.01	0.40	0.30	0	0.21	0	1.50	4.48	19.05	23.53	26.1	10.1	26.1
28	401.0	1.08	0.82	0.07	0	0.52	0	1.30	4.30	19.31	24.07	20.6	10.1	20.6
50	450.2	1.72	0.05	0	0	0.52	0	1.31	4.20	19.07	24.17	20.6	10.1	20.6
0	400.8	1.20	0.34	0.30	0	0.17	0	1.33	3.43	21.10	24.53	27.2	10.1	27.2
28	404.3	1.34	0.78	0.17	0	0.28	0	1.18	3.75	19.90	23.65	26.9	10.1	26.9
50	404.7	1.12	0.82	0.28	0	0.17	0	1.12	3.51	20.38	23.80	26.7	10.1	26.7
0	400.7	1.40	0.40	0.34	0	0.27	0	1.45	3.98	21.40	25.38	27.4	10.1	27.4
28	400.0	1.34	0.80	0.27	0	0.27	0	1.35	4.12	22.21	26.33	28.4	10.1	28.4
50	400.1	1.28	1.01	0.20	0	0.32	0	1.43	4.24	20.83	25.07	27.4	10.1	27.4
0	41.3	0.14	0.00	0.00	0	0.12	0	0.15	0.23	0.07	1.13	0.12	0.12	0.12

TABLE XXIV.

Survey of the Transformations taking place during storage (two months).

Group of substances	Exper. I (1901)	Experiment II (1903)			Experiment III (1905)		
	Over- ripeness	Yellow- ripeness	Full- ripeness	Over- ripeness	Yellow- ripeness	Full- ripeness	Over- ripeness
Gr. of dry substance in 10,000							
corns	o	o	? (+)	? (o)	+	o	? (o)
Albumin I	÷	÷	+	+	+	+	+
— II	+	+	+	? (+)	? (+)	+	+
Denuclein	? (o)	o	o (+)	o	÷	? (o)	÷
Protease	o	o	o	o	o	o	o
Peptone	? (o)	o	o	o	+	? (o)	o
Ammonia, Amine-Amid . .	o	÷	o	? (+)	÷	+	o
Soluble nitrogenous combin.	? (÷)	÷	o	+	÷	? (o)	+
Insoluble nitrogenous „	+	o	o (+)	o	o	o	o
Total Nitrogen	+	o	o (+)	o	o	o	o
Mineral constituents	o	o	o	o	o	o	o
Acid	+	o	o	o	+	+	o

The signification of the signs is explained on p. 282 (Table XX).

between them, so that the present table must be interpreted in exactly the same manner as Table XX.

Here I need only call attention to the fact that the concordance found to exist between the two tables is a conclusive proof that no waste of dry matter takes place during the storage of barley, providing the barley is stored under favourable conditions.

7. Researches on the Chemical Composition of the Dry Matter of Barley as dependent on Differences of Species, Variety and Type.

In the foregoing pages we have pointed out the influence which the degree of maturity and the duration of storage may exert on the chemical composition of the dry matter of barley. We now proceed to inquire into the question as to its dependence on differences of species, variety and type.

At first I attempted to solve this problem by examining different sorts of barley as met with in commerce. The materials

thus gathered were, however, of such a nature that it proved to be quite impossible to form a notion of the influence which might be exerted on the composition of the dry matter by differences of species, variety and type. This failure was a natural consequence of the circumstance that a lot of barley as obtainable in the market is really a mixture of different varieties, which have been cultivated under dissimilar conditions of soil and manuring and harvested at different stages of maturation, besides having perhaps been stored differently and not during the same length of time.

For the purpose of procuring suitable experimental materials, I applied — by the advice of Professor T. Westermann — to the scientific director of the Swedish Seed-corn Association (Sveriges Utsädesförening) at Svalöf, Professor Hjalmar Nilsson. Mr. Nilsson, interesting himself warmly for the matter, was ready to furnish me with the requisite materials, and with great obligingness undertook to make a convenient selection among the pure species, varieties and types at his disposal.

Since the Swedish Seed-corn Association at Svalöf has adopted the Pedigree system — one corresponding exactly to the ingenious single-cell system devised by E. C. Hansen with regard to lower organisms —, the materials sent me from Svalöf were altogether reliable in regard to purity of species, variety and type. Also in reference to uniformity in the conditions of soil, manuring and climate, they left nothing to be desired, as all the samples had been cultivated under conditions as nearly identical as practicable and, moreover, were all of one and the same crop (1904). There is, however, one factor which cannot be supposed to be identical for all the samples, namely the stages of maturity at which they had been reaped. The results obtained in the preceding experiments have, however, shown how the chemical composition of the dry matter is affected by this factor. Therefore, although we shall have to count with differences caused by it, we shall nevertheless be able to obtain a reliable expression for the influence exerted by differences of species, variety and type.

For use in these researches I received from the Swedish Station at Svalöf 36 different barley samples, which I examined by the method described above (II, p. 244).

Table XXV (see p. 294—95) gives a synopsis of the results

arrived at. With the exception of water and dry matter, all the substance groups have been calculated in such a manner as to express the number of gr. of substance found in 1000 gr. of dry matter.

It will be seen from the percentages of water that on examination all the samples contained much the same amount of water. With regard to the figures relating to "gr. of dry matter in 10,000 corns", it may be observed that they may be considered as a direct expression for the corn size. It is true, we cannot take it for granted that all the 36 barley samples have had the same specific gravity; yet, on an inspection of Table XXV it is easily perceptible that the values found for water, nitrogenous substances and ash, consequently also for the other substances — mainly carbohydrates —, vary in our experiments within so narrow limits as to warrant the assumption that the specific gravity of the dry matter cannot have been affected to any appreciable degree by these variations. Besides, it is to be observed that none of the samples examined have contained proteoses in greater quantity than mere traces (even type sample XI does not, I believe, exceed the permissible amount), from which fact it may be inferred that none of the samples have been exposed to a beginning germination. In running over the numbers given in the table, it is all but astonishing that we meet with such small variations in each column, save in that of dry matter.

In order to solve the problem under notice on the basis of those many analytical details, it will be advisable to examine each type separately. To begin with, we shall then have to ascertain if within each type we meet with greater divergences in the composition of dry matter than can be accounted for by differences of degree of maturity and time of storage. A view in this direction may be had by considering first the maximum and minimum values within each type, and then the differences between these two values. In Table XXVI I have brought together the experimental results in this manner.

The lowermost two series in this table contain numbers indicating the greatest deviation found in each group of substances when one and the same barley sample is examined after being reaped yellow-ripe and then over-mature, and after these different samples have been subjected to 0 to 60 days' storage.

TABLE XXVII.

Means of the samples of "Hordeum distichum"			Number of samples examined	Gr. of dry substance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain -- gr. of nitrogen in the form of							1000 gr. of dry substance contain		Sum of		
Variety	Type	Albumin			Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia Amine-Amid	Soluble combinat.	Insoluble combinat.	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid & cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein Proteose and Peptone	
		I	II													
nutans	I	9	395.9	0.79	0.58	0.27	0.01	0.17	0.80	2.62	14.46	17.08	25.17	75.2	1.37	0.45
	II	5	423.5	0.76	0.61	0.25	0.01	0.17	0.72	2.52	15.52	18.04	25.79	76.9	1.37	0.43
	III	4	400.0	0.87	0.58	0.27	0.02	0.19	0.82	2.75	15.97	18.72	24.28	85.4	1.45	0.48
	IV	3	405.7	0.65	0.66	0.30	0.07	0.17	0.79	2.64	14.90	17.54	26.37	81.6	1.31	0.54
Maximum Minimum			423.5	0.87	0.66	0.30	0.07	0.19	0.82	2.75	15.97	18.72	26.37	85.4	1.45	0.54
			395.9	0.65	0.58	0.25	0.01	0.17	0.72	2.52	14.46	17.08	24.28	75.2	1.31	0.43
Difference			27.6	0.22	0.08	0.05	0.06	0.02	0.10	0.23	1.51	1.64	2.09	10.2	0.14	0.11
Means of all samples			404.6	0.78	0.60	0.27	0.02	0.17	0.79	2.63	15.06	17.69	25.32	78.5	1.38	0.46
erectum	V	1	439.8	0.55	0.86	0.32	0.07	0.11	0.82	2.73	14.85	17.58	26.10	79.6	1.41	0.50
	VII	6	434.7	0.93	0.41	0.24	0.03	0.22	0.87	2.70	14.61	17.31	23.87	80.3	1.34	0.49
	VIII	1	417.2	1.37	0.41	0.19	0.05	0.22	0.83	3.07	16.25	19.32	23.99	70.0	1.78	0.46
Maximum Minimum			439.8	1.37	0.86	0.32	0.07	0.22	0.87	3.07	16.25	19.32	26.10	80.3	1.78	0.50
			417.2	0.55	0.41	0.19	0.03	0.11	0.82	2.70	14.61	17.31	23.87	70.0	1.34	0.46
Difference			22.6	0.82	0.45	0.13	0.04	0.11	0.05	0.37	1.64	2.01	2.23	10.3	0.44	0.04
Means of all samples			433.1	0.94	0.47	0.24	0.04	0.20	0.85	2.74	14.86	17.60	24.17	78.9	1.41	0.48
Analytical errors			3.7	0.09				0.12	0.17	1.52	1.59	2.02	9.8	0.09		

XXV.

1000 gr. of dry substance contain — gr. of Nitrogen in the form of									1000 gr. of dry substance contain		Sum of	
Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia Amine- Amid	Soluble combinat.	Insoluble combinat.	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein Proteose and Peptone
I	II											
085	0.81	0.20	0	0.27	0.80	2.93	15.60	18.53	24.60	75.9	1.66	0.47
105	0.51	0.22	0	0.14	0.88	2.80	15.48	18.28	24.55	74.5	1.56	0.36
090	0.44	0.33	0	0.15	0.77	2.59	15.14	17.73	24.89	74.8	1.34	0.48
065	0.65	0.34	0	0.15	0.78	2.57	14.95	17.52	24.35	80.1	1.30	0.49
066	0.73	0.27	0.07	0.19	0.81	2.73	14.25	16.98	26.04	85.2	1.39	0.53
082	0.67	0.27	0	0.12	0.82	2.70	14.08	16.78	24.63	77.2	1.49	0.39
066	0.50	0.21	0	0.21	0.79	2.37	14.38	16.75	25.92	66.6	1.16	0.42
079	0.42	0.29	0	0.16	0.79	2.45	13.57	16.02	24.50	66.6	1.21	0.45
075	0.47	0.31	0	0.14	0.78	2.45	12.73	15.18	27.08	75.9	1.22	0.45
078	0.64	0.31	0	0.24	0.71	2.65	16.57	19.22	26.88	82.9	1.42	0.52
100	0.48	0.32	0	0.18	0.74	2.72	15.80	18.52	26.37	83.7	1.48	0.50
063	0.80	0.20	0	0.15	0.68	2.46	15.37	17.83	24.95	68.2	1.43	0.35
061	0.67	0.25	0.07	0.18	0.74	2.52	15.28	17.80	25.96	78.7	1.28	0.50
080	0.46	0.19	0	0.12	0.74	2.31	14.54	16.85	24.79	71.1	1.26	0.31
086	0.50	0.34	0	0.16	0.86	2.72	16.89	19.61	26.53	96.9	1.36	0.50
085	0.61	0.27	0.07	0.19	0.77	2.76	16.27	19.03	24.10	89.7	1.46	0.53
077	0.64	0.26	0	0.15	0.86	2.68	16.08	18.76	23.06	80.3	1.41	0.41
098	0.58	0.22	0	0.24	0.79	2.81	14.65	17.46	23.41	74.6	1.56	0.46
067	0.67	0.35	0.07	0.12	0.90	2.78	15.99	18.77	24.82	82.1	1.34	0.54
064	0.71	0.26	0.07	0.19	0.83	2.70	15.78	18.48	26.36	82.8	1.35	0.52
064	0.61	0.28	0.08	0.20	0.64	2.45	12.91	15.36	27.94	79.8	1.25	0.56
055	0.86	0.32	0.07	0.11	0.82	2.73	14.85	17.58	26.10	79.6	1.41	0.50
120	0.49	0.21	0	0.23	1.02	3.15	15.51	18.66	25.19	85.4	1.69	0.44
086	0.54	0.27	0	0.27	0.80	2.74	15.87	18.61	22.29	76.2	1.40	0.54
107	0.35	0.17	0.07	0.17	0.89	2.72	14.78	17.50	23.88	84.5	1.42	0.41
080	0.33	0.26	0.05	0.26	0.88	2.67	14.01	16.68	23.72	77.2	1.22	0.57
064	0.52	0.26	0	0.19	0.82	2.43	14.06	16.49	23.42	77.8	1.16	0.45
090	0.22	0.24	0	0.18	0.78	2.39	13.55	15.94	24.73	80.6	1.12	0.49
037	0.41	0.19	0.05	0.22	0.83	3.07	16.25	19.32	23.99	70.0	1.78	0.46
092	0.30	0.27	0	0.17	0.96	2.62	15.84	18.46	23.84	73.6	1.22	0.44
093	0.38	0.27	0	0.21	0.86	2.75	16.21	18.96	25.58	74.2	1.41	0.48
093	0.48	0.21	0	0.17	0.77	2.56	14.68	17.24	24.47	74.8	1.41	0.38
074	0.35	0.35	0.13	0.13	1.04	2.74	20.10	22.84	26.28	85.7	1.09	0.61
081	0.36	0.24	0.06	0.18	0.81	2.46	17.37	19.83	24.09	76.2	1.17	0.48
093	0.38	0.21	0	0.28	0.97	2.77	14.93	17.70	24.44	101.7	1.31	0.49
082	0.36	0.36	0.07	0.20	0.96	2.77	14.84	17.61	25.76	95.9	1.18	0.63

Species and Variety of barley	Type	Number of sam- ples examined	1000 gr. of dry substance contain												gr. of nitrogen in the form of							1000 gr. of dry subst. contain					Sum of	
			Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia Amine- Amid	Soluble combinat.	Insoluble combinat.	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein Proteose and Peptone													
			I	II																								
			Gr. of dry substan- ce in 10,000 corns																									
			I		II																							

These numbers are deduced from Table XXII, p. 288, and Table XXIII, p. 290, respectively. They cannot, of course, be taken as a standard in the case under consideration; but at any rate they may help us to form an approximate estimate of the fluctuations with which we have to count if we wish to know whether a group of barley samples — of one type — may be supposed to have a constant composition of dry matter or not.

On comparing the differential numbers stated in Table XXVI with the last two series of numbers, we now arrive at the following conclusion: — The differences in the composition of dry matter within each type are, in each of the cases under notice, comparatively so small as to be attributable to fluctuations in the degree of ripeness and time of storage of the individual samples.

That the duration of storage has not been the same, appears from the fact that the examination of the materials occupied three months.

Accordingly, we shall be safe in maintaining that the composition of dry matter in the individual samples within each type exhibit a sufficient uniformity for us to be able to make use of the materials for a calculation of mean values.

Table XXVII gives a synopsis of these relating to each type of *Hordeum distichum*. Besides, it gives the maximum and minimum values of the type means within the same variety, together with the differences between these.

A consideration of the differential numbers within the variety "nutans" leads to the conclusion that the difference in the chemical composition of dry matter between the various types of this variety is so small that any influence exerted by the barley type in itself on the chemical composition of the dry matter is quite out of the question. A similar conclusion may without doubt be drawn with regard to the various types of the variety "erectum". In this case, however, it is to be observed that we have no real average values for the types V and VIII, since these are represented by only one sample each. Consequently, in judging the differential numbers relating to *Hordeum distichum erectum*, we must make some allowance for the influence exerted on the composition of dry matter by a difference of maturity and duration of storage — see Table XXVI, the lowermost two series.

The accompanying Table XXVIII brings together the mean values for all the samples of the species "Hordeum distichum" and "Hordeum tetrastichum". On considering the differences between these two series, we are led to exactly the same conclusion with respect to the influence of the species on the composition of dry matter as stated above in regard to the influence of the variety.

Thus, these researches and considerations lead to the surprising result that the chemical composition of the dry matter of barley is not affected by differences of species, variety or type, as far as the various groups of nitrogenous substances, ash and water-soluble acid combinations are concerned.

That the size of the corns is influenced in a greater or less degree by differences of species and variety, is a well-known fact¹⁾.

¹⁾ The corns of tetrastichum are smaller than those of distichum.

TABLE XXVIII.

Mean values of the samples	Gr. of dry substance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain — gr. of nitrogen in the form of								1000 gr. of dry substance contain		Sum of		Number of samples		
		Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia Amine- Amid	Soluble combinat.	Insoluble combinat.	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc. n. Na OH	Albumins I and II		Denuclein Proteose and Peptone	
		I	II													
Hordeum distichum . . .	416.7	0.82	0.56	0.26	0.03	0.18	0.80	2.65	15.01	17.66	25.00	78.6	1.38	0.47	29	
Hordeum tetrastichum .	290.4	0.88	0.37	0.27	0.04	0.19	0.91	2.66	16.29	18.95	24.92	83.2	1.25	0.50	7	
Difference .	126.3	0.06	0.19	0.01	0.01	0.01	0.11	0.01	1.28	1.29	0.08	4.6	0.13	0.03		
Analytical errors	3.7	0.09							0.12	0.17	1.52	1.59	2.02	9.8	0.09	

Accordingly, if we meet with barley crops differing, as far as the above substance-groups are concerned, in respect of dry matter composition, the reason of such a difference must be supposed to lie in the circumstance that the samples have been grown under different conditions regarding the chemical and physical nature of the soil, the manurial treatment and the climatic peculiarities of their native places. That the chemical composition of barley dry matter is seriously affected by such conditions and probably various other factors, has been clearly established by other observers¹⁾. But a knowledge of their influence on composition of the dry matter with regard to the various groups of proteine substances was still lacking, and with a view to elucidate this important question I set on foot a series of analyses of a certain number of barley samples originating from very different habitats²⁾. The results of these investigations are tabulated on the next page. In judging the value of these results with regard to the question here before us, it must, however, be borne in mind that the analyses refer to common commercial samples. We have therefore to count with the possibility that the various samples may have been harvested at different stages of maturity and stored during different lengths of time. This being the case, it follows that here again we must take into consideration the variations which a difference in the degree of maturity and duration of storage may produce in the chemical composition of the dry matter. The values expressing the influence of these two factors are given in the lowermost two series of Table XXIX. The latter also sets forth the maximum and

¹⁾ J. König: *Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genussmittel*. 4. Aufl., Bd. I, pp. 481—519. — On the pp. 491 to 508 are recorded a very large number of analyses of malting barleys from all parts of the world, which show that the dry matter composition, as far as total nitrogen and mineral constituents are concerned, is always more or less influenced by the native place. PP. 509—11 give a certain number of analyses of barleys grown in varying manuring experiments; from these it appears that certain manurial substances are able to modify the dry matter composition both with regard to total nitrogen and ash. Finally, a table on p. 516 shows how the percentage of nitrogen is affected by the date of sowing. —

As to the influence of manurial substances, I may also refer to a very interesting and instructive memoir by J. Stoklasa: *Zeitschr. f. das gesammte Brauw.* 28, 502 (1905).

²⁾ All the samples were common field, or commercial, barleys.

The accompanying Table XXVIII brings together the mean values for all the samples of the species "*Hordeum distichum*" and "*Hordeum tetrastichum*". On considering the differences between these two series, we are led to exactly the same conclusion with respect to the influence of the species on the composition of dry matter as stated above in regard to the influence of the variety.

Thus, these researches and considerations lead to the surprising result that the chemical composition of the dry matter of barley is not affected by differences of species, variety or type, as far as the various groups of nitrogenous substances, ash and water-soluble acid combinations are concerned.

That the size of the corns is influenced in a greater or less degree by differences of species and variety, is a well-known fact¹⁾).

1) The corns of tetrastichum are smaller than those of distichum.

TABLE XXVIII.

Mean values of the samples	Gr. of dry substance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain — gr. of nitrogen in the form of								1000 gr. of dry substance contain		Sum of		Number of samples	
		Albumin		Denuclein	Protease	Peptone	Ammonia Amine- Amid	Soluble combinat.	Insoluble combinat.	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc. n. Na OH	Albumins I and II		Denuclein Protease and Peptone
		I	II												
Hordeum distichum . . .	416.7	0.82	0.56	0.26	0.03	0.18	0.80	2.65	15.01	17.66	25.00	78.6	1.38	0.47	29
Hordeum tetrasichum .	290.4	0.88	0.37	0.27	0.04	0.19	0.91	2.66	16.29	18.95	24.92	83.2	1.25	0.50	7
Difference .	126.3	0.06	0.19	0.01	0.01	0.01	0.11	0.01	1.28	1.29	0.08	4.6	0.13	0.03	
Analytical errors	3.7	0.09					0.12	0.17	1.52	1.59	2.02	9.8	0.09		

Accordingly, if we meet with barley crops differing, as far as the above substance-groups are concerned, in respect of dry matter composition, the reason of such a difference must be supposed to lie in the circumstance that the samples have been grown under different conditions regarding the chemical and physical nature of the soil, the manurial treatment and the climatic peculiarities of their native places. That the chemical composition of barley dry matter is seriously affected by such conditions and probably various other factors, has been clearly established by other observers¹⁾. But a knowledge of their influence on composition of the dry matter with regard to the various groups of proteine substances was still lacking, and with a view to elucidate this important question I set on foot a series of analyses of a certain number of barley samples originating from very different habitats²⁾. The results of these investigations are tabulated on the next page. In judging the value of these results with regard to the question here before us, it must, however, be borne in mind that the analyses refer to common commercial samples. We have therefore to count with the possibility that the various samples may have been harvested at different stages of maturity and stored during different lengths of time. This being the case, it follows that here again we must take into consideration the variations which a difference in the degree of maturity and duration of storage may produce in the chemical composition of the dry matter. The values expressing the influence of these two factors are given in the lowermost two series of Table XXIX. The latter also sets forth the maximum and

¹⁾ J. König: *Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genussmittel*. 4. Aufl., Bd. I, pp. 481—519. — On the pp. 491 to 508 are recorded a very large number of analyses of malting barleys from all parts of the world, which show that the dry matter composition, as far as total nitrogen and mineral constituents are concerned, is always more or less influenced by the native place. PP. 509—11 give a certain number of analyses of barleys grown in varying manuring experiments; from these it appears that certain manurial substances are able to modify the dry matter composition both with regard to total nitrogen and ash. Finally, a table on p. 516 shows how the percentage of nitrogen is affected by the date of sowing. —

As to the influence of manurial substances, I may also refer to a very interesting and instructive memoir by J. Stoklasa: *Zeitschr. f. das gesammte Brauw.* 28, 502 (1905).

²⁾ All the samples were common field, or commercial, barleys.

TABLE XXIX.

Sort of barley	Habitat	Year	% of water in the sample	Gr. of dry substance in 10,000 corns	1000 gr. of dry substance contain — gr. of nitrogen in the form of								1000 gr. of dry substance contain		Sum of		
					Albumin		Denuclein	Proteose	Peptone	Ammonia Amine-Amid	Soluble combinations	Insoluble combinations	Sum of Nitrogen	Gr. of ash	Acid ∞ cc. n. Na OH	Albumins I and II	Denuclein Proteose and Peptone
					I	II											
Goldthorpe	Denmark	1901	15.34	390.3	1.02	0.52	0.26	0	0.19	0.77	2.76	12.04	14.80	26.7	73.5.	1.54	0.45
Unknown	"	1901	15.05	358.7	0.89	0.71	0.32	0	0.13	0.89	2.94	14.46	17.40	26.1	82.1	1.60	0.45
"	"	1902	19.63	393.7	0.95	0.47	0.41	0	0.13	0.81	2.77	13.13	15.90	—	77.4	1.42	0.54
Hanna	Moravia	1901	13.74	377.8	0.95	0.69	0.38	0	0.12	0.95	3.09	15.41	18.50	25.9	76.6	1.64	0.50
"	"	1901	13.74	388.2	1.01	0.44	0.44	0	0.07	0.94	2.90	12.42	15.32	28.6	81.1	1.45	0.51
"	"	1902	13.51	390.1	1.01	0.50	0.32	0	0.19	0.90	2.92	14.58	17.50	26.5	83.3	1.51	0.51
Unknown	Asia Minor	1901	11.44	408.3	0.92	0.31	0.37	0	0.12	0.61	2.33	13.97	16.30	23.7	65.8	1.23	0.49
"	California	1901	11.91	421.1	0.56	0.56	0.30	0	0.13	0.93	2.48	11.72	14.20	31.0	79.5	1.12	0.43
"	Egypt	1901	11.60	288.5	0.93	0.36	0.37	0	0	1.24	2.90	13.50	16.40	39.1	35.2	1.29	0.37
Maximum				421.1	1.02	0.71	0.44	0	0.19	1.24	3.09	15.41	18.50	39.1	83.3	1.64	0.51
Minimum				288.5	0.56	0.31	0.26	0	0	0.61	2.33	11.72	14.20	23.7	35.2	1.12	0.37
Difference				132.6	0.46	0.40	0.18	0	0.19	0.63	0.76	3.69	4.30	15.4	48.1	0.52	0.14
Greatest difference found		from yellow-ripen. to over-maturity from 0 to 60 days ¹ storage															
					63.7	0.72	0.26	0.09	0.09	0.14	0.17	0.56	4.27	3.71	1.3	45.1	0.52
					19.1	0.70	0.55	0.30	0.11	0.31	0.48	0.93	3.04	2.80	1.5	27.7	0.14
																	0.11

minimum values for the whole of the experimental material, together with the differences between the two series of numbers.

On comparing the differential numbers with the last two series, it will be noticed that, after all, it is only in the case of mineral constituents (ash) that we meet with a really considerable and indisputable variation. Total nitrogen and amine-amid nitrogen also exhibit some variation, whereas in the case of all the other groups of constituents the fluctuations are comparatively so small as to be attributable exclusively to differences in degree of maturity and duration of storage. Although the materials submitted to the examination may not have been sufficiently copious to give a conclusive answer to the question, yet I believe I am safe in maintaining that the cultural¹⁾ condition of the soil and the climatic conditions have influence on the ash content of the barley dry matter and, to a certain extent, also on the amount of total nitrogen and amine-amid nitrogen, whereas the other groups of nitrogenous constituents are affected in a less degree by these factors than by such as the degree of maturity and duration of storage.

8. Concluding Remarks.

Before leaving this subject, I cannot forbear to make a short remark which is forced upon my mind by one of the rather surprising results (so they seem to me at least) which the present research has brought to light.

I allude to the statement made on p. 300, that differences of species, variety and type do not *per se* affect the chemical composition of the dry matter of barley, as far as the various groups of nitrogenous substances, mineral constituents and water-soluble acid combinations are concerned.

There is evidently some reason to presume that this result might lead to the view that endeavours towards the improvement of barley are in reality established on a less solid foundation than was hitherto supposed. I believe, however, that on considering the question in all its bearings we shall arrive at a directly opposed conclusion.

¹⁾ I use this expression to denote not solely the natural condition of the soil, but also the manuring cultivation.

If we imagine that differences of species, variety and type exerted a direct influence upon the chemical composition of the dry matter, whilst at the same time we know positively that other factors (such as conditions of soil, manuring, *etc.*) come also into play, it follows that, practically, all endeavours at improvement must ultimately give a very precarious result. Let us suppose for example that by improvement we succeed in producing a culture which, under the conditions of soil, manurial treatment *etc.*, obtaining in the place concerned, gives the result wished for with respect to the composition of dry matter. When this culture is subjected to practical cultivation and brought under the action of different conditions of soil, manuring *etc.*, it is obvious that the ultimate crop is likely to be of a different condition from that wished for and aimed at, because the result must necessarily be determined in degree by the action of the altered conditions of soil, manuring *etc.* Under such circumstances we cannot tell whether the result aimed at can be most easily obtained by trying another improvement culture or by modifying the conditions of cultivation (nutritive matters of the soil, *etc.*). In this way it would be rather a difficult matter to attain the object.

If, on the contrary, we abide by the result arrived at by the present investigations, it appears that the principle upon which the endeavours toward improvement of barley have been hitherto conducted can only settle one part of the matter, namely the preparation of a growth decidedly the best suited to local requirements (conditions of soil, manuring *etc.*). But in regard to the chemical composition of the dry matter, it has now been established that the endeavours must be governed by two fundamental principles, an internal and an external one, the former being without any influence upon the chemical composition of dry matter, whilst the latter is, on the contrary, decisive in this respect.

Accordingly, any work having for its object the improvement of barley, must consist of two parts, which are not interdependent, namely: —

(1) The purely botanical part, the immediate object of which must be to provide pure species, varieties and types, and to test the practical value and constancy of such pure cultures — in short, to make a selection.

(2) That coming within the range of agricultural chemistry and having for its object to test the behaviour of the selected cultures in regard to the action of the various external factors.

It is only when these two parts of the work can be made to concur towards the attainment of the common end aimed at that the efforts can be expected to yield practically applicable results, yielding a proper remuneration for the great amount of labour bestowed upon this task.

Professor Hjalmar Nilsson, the scientific director of the Swedish Seed-corn Association at Svalöf, is working just now upon a plan nearly coinciding with the one propounded above. The very extensive and thorough-going labours of this institution stand a fair chance of giving highly valuable results also in future.

9. Main Results.

These may be summed up as follows: —

(1). Owing to the comparatively great error (about 1 % of proteine) with which we have to count in estimating the percentage of proteine matter in a barley crop or lot of barley, I consider it misleading to use this quantity (% of proteine) as a factor determining the quality of malting barley. Moreover, the foundation underlying the valuation by amount of nitrogen is in some measure sapped by the circumstance that the modes of working used in malting, brewing etc., in different localities are very different (*vide* p. 255).

(2). Barleys which have had a growth and ripening period of short duration are much more liable to suffer a loss of dry matter by over-ripening than such barleys as have had a long developmental period. Besides, it appears that the corn size depends to a certain extent upon the duration of that period, of course within the same species and variety (*vide* p. 271).

(3). Barley has acquired full maturity when the conversion of soluble into insoluble carbohydrates and soluble into insoluble proteids has ceased or reached its maximum (*vide* p. 273).

(4). When the development of the barley grain — from green-ripeness to yellow-ripeness — takes place during a normal period of development, there exists an absolute equilibrium between the quantity of nitrogen received in a given time and the nitrogen quantity converted in the same time into insoluble

combinations; whereas the transformation of soluble nitrogen combinations into insoluble ones in a short period of development takes place at a quicker rate than does the intake of nitrogen, the reverse being the case in a long period of development (*vide* p. 275).

(5). The condensation of amine-amid combinations into soluble proteids takes place with greater intensity during a short than during a long period of development, and this process is very nearly in an equilibrium with the further intake of nitrogen as soon as the stage of yellow-ripeness has been reached (*vide* p. 278).

(6). The proteoses cannot be supposed to act as intermediate terms in the condensation of amine-amid combinations into protein individuals of a higher order, but are exclusively to be regarded as hydrolytic cleavage products of proteids of a higher order (*vide* p. 280).

(7). An appreciable amount of proteose in a barley crop must always be considered as indicative of rather unfavourable harvest conditions (*vide* p. 281).

(8). A loss of dry matter (respiration loss) is not likely to take place during the storage of barley, provided the storage takes place under suitable conditions, and providing also the barley sample has reached a suitable degree of maturity before being reaped (*vide* pp. 283 and 291).

(9). The ripening barley grain is tending toward a state of equilibrium in respect of its nitrogenous constituents; when, on the reaping of the barley, this state has been reached, it is not disturbed during storage, except in the case of albumins I and II (*vide* pp. 284 and 289).

(10). The amount of albumin I in proportion to dry matter decreases in a greater or less degree according as the barley is allowed to attain a greater and greater degree of maturity, whereas the quantities of albumin II, insoluble nitrogen, total nitrogen and water-soluble acid combinations increase more or less. The amount of water-soluble nitrogenous combinations is also subject to considerable fluctuations, which, however, are sometimes positive, sometimes negative. Denuclein, proteose (= 0), peptone, ammonia amine-amid and mineral constituents — in each individual barley sample — show a constant weight in the dry matter, as soon as the corn has reached its full

development; consequently, the quantities of these substances remain constant during the real maturation process (*vide* p. 286—89).

(11). If reaped at an early stage, barley is less rich in nitrogen than it is if reaped later (*vide* p. 289).

(12). The chemical composition of dry matter in respect of the various groups of nitrogenous substances, mineral constituents and water-soluble acid combinations — is, properly speaking, not dependent on the species, variety or type of barley (*vide* p. 300).

(13). The cultural condition of the soil, as also climatic conditions, exert some influence on the amount of mineral constituents in barley dry matter, and to a certain extent also upon the amounts of total nitrogen and amine-amid nitrogen, whereas with regard to the other groups of nitrogenous substances, the influence of these factors is less marked than the degree of maturity and time of storage (*vide* p. 303).

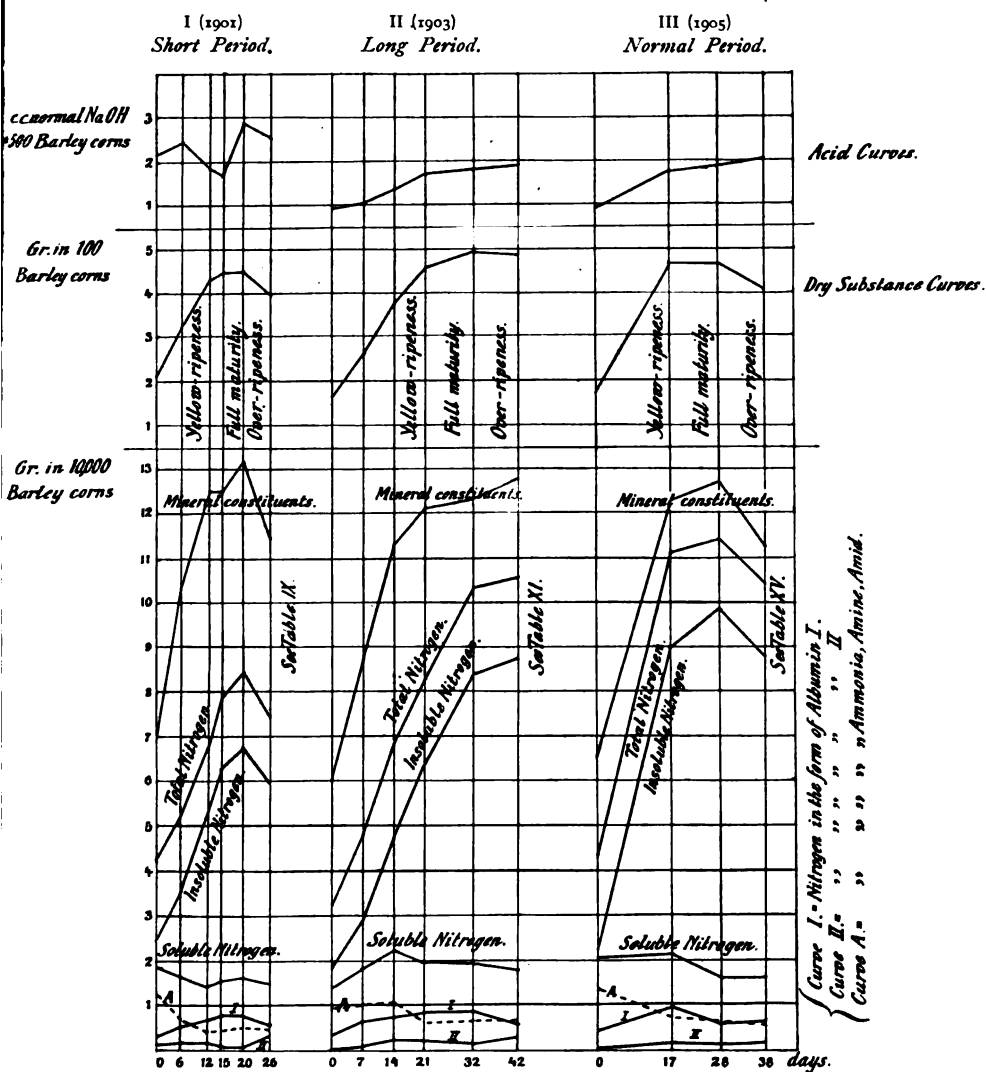
In conclusion, I have to acknowledge my indebtedness, and to offer my hearty thanks, to the Institutions and Gentlemen who most obligingly enabled me to procure the requisite experimental materials and to set on foot the necessary investigations. I also feel impelled to tender my sincere thanks to Professor E. Chr. Hansen and Dr. S. P. L. Sørensen for valuable advice and assistance in elaborating the present paper.

Copenhagen, November 1905.



CURVE TABLE I.

BARLEY RIPENING EXPERIMENT.



III Normal Period.

